

# PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS UND WILLIAM SEIFRIZ  
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK UND FRIEDL WEBER  
ROSTOCK GRAZ

BAND XLIV, HEFT 1  
MIT 48 TEXTABILDUNGEN  
ABGESCHLOSSEN AM 10. MAI 1954



WIEN  
SPRINGER-VERLAG  
1954

Protoplasma

Die Zeitschrift

**Protoplasma**

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

*Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,  
Graz, Schubertstraße 51, Österreich*

oder an

*Prof. Dr. J. Speh, Zoologisches Institut,  
(3a) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, DDR*

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

*Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5,  
Fernsprecher: U 26-5-00 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.*

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezieher der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (34 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

**Der Verlag**

**XLIV. Band**

**Inhaltsverzeichnis**

**1. Heft**

Abhandlungen

Seite

<b>Imaizumi, T.:</b> Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile. I. . . . .	1
<b>Imaizumi, T., et Y. Kimoto:</b> Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile. II. . . . .	11
<b>Imaizumi, T.:</b> Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile. III. . . . .	22
<b>Pisek, A., und W. Larcher:</b> Zusammenhang zwischen Austrocknungsresistenz und Frosthärte bei Immergrünen . . . . .	30
<b>Pfaffner, H.:</b> Vorläufige Versuche über die Elastizität des Atraktoplasmas . . . . .	47
<b>Kinzel, H.:</b> Theoretische Betrachtungen zur Ionspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften . . . . .	52
<b>Biebl, R.:</b> Zellwandpermeabilität einiger Moose . . . . .	73
<b>Kriszat, G.:</b> Über periodische Änderungen im Zustand der Plasmamembran und des Zytoplasmas während des Ein-Zellstadiums des befruchteten Seeigels . . . . .	80
<b>Wicklund, Elsa:</b> On the Influence of Adenosine Triphosphate (ATP) on the Membrane Formation and the Cytoplasmic State in the Sea Urchin Egg . . . . .	98

*Fortsetzung auf der III. Umschlagseite*

Institut de zoologie, Faculté des sciences, Université de Kioto, Japon

## **Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile**

### **I. La variation du volume de l'embryon pendant la première période du développement**

Par

**Tadashi Imaizumi**

Avec 3 graphiques et 20 figures

(Reçu le 30 juin 1953)

#### **Introduction**

Pendant la première période du développement de la drosophile, on a observé quelques caractéristiques remarquables, telles que la migration des noyaux, la formation et le mouvement des cellules polaires, la formation du blastoderme etc. Ces phénomènes ont fait l'objet d'observations cytologiques et morphologiques détaillées par Huettnner (1923, 1924), Parks (1937, 1938), Poulson (1937, 1940, 1947) et Rabinowitz (1941) etc., leurs travaux ont été développés en 1950 par Sonnenblick. Mais aucune investigation n'a été faite à cause de la difficulté de la méthode expérimentale en ce qui concerne le mécanisme du développement. D'autre part, bien que quelques mutants dont les caractères létaux apparaissant déjà chez l'embryon aient été découverts (par exemple Poulson 1940, 1947, Hadorn 1951), les causes de la mort n'ont pas été tirées au clair.

Si on place au point de vue physiologique, il semble certain que des corrélations doivent exister entre les changements de forme de l'embryon et les mouvements des substances qui constituent le système dispersé du protoplasme de l'œuf. Une analyse physiologique du mouvement de ces substances se montra nécessaire si on veut résoudre le mécanisme du développement, qu'il soit normal ou anormal. C'est pourquoi nous avons étudié les structures fondamentales du jeune embryon et leur variations pendant la première période du développement.

Une série de ces recherches a été exécutée sous la direction du Prof. K. Nakamura; nous lui apportons ici l'expression de notre reconnaissance la plus sincère pour l'intérêt qu'il a porté à nos travaux et pour ses excellents conseils.

### Matériels employés

Des embryons de trios souches ont été employés comme matériels : la forme sauvage d'Oregon-R chez *D. melanogaster*, celle de Kitakata-24 chez *D. virilis* et le mutant de X-attaché ( $g^2ty/\widehat{y\widehat{y}}$ ) chez *D. melanogaster*. Le chorion qui recouvre l'œuf peut être dissous par une solution de NaOCl, suivant la méthode de Slifer (1945) et de Hill (1947). On peut alors observer facilement l'embryon à travers la membrane vitelline transparente. Les observations ont été exécutées sur des embryons déchorionnés plongés dans une solution de Ringer (NaCl 5,0 g, KCl 0,2 g, CaCl<sub>2</sub> 0,1 g et eau distillée 1000 cc), les embryons s'y développent d'habitude et ils sont incubés dans cette solution.

### Observations

#### 1. Les stades du développement (Figs. 1—18).

Un diagramme standard de la marche de développement est nécessaire

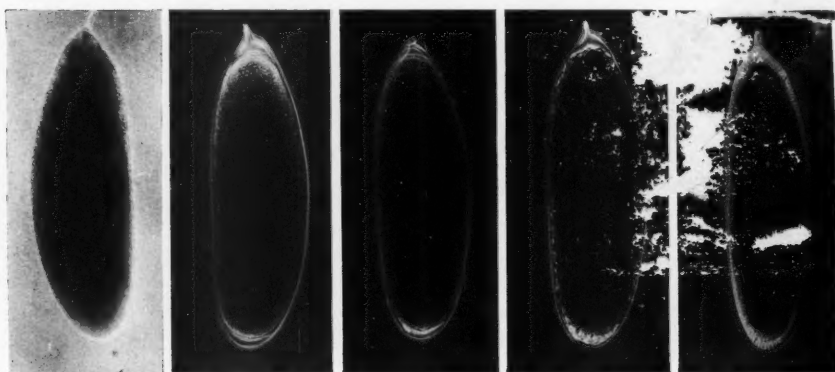


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 1. Stade 1. Fig. 2. Stade 2. Fig. 3. Stade 3. Fig. 4. Stade 4. Fig. 5. Stade 5.

pour cette investigation, mais aucun diagramme parfait n'a été décrit jusqu'aujourd'hui. C'est pourquoi des descriptions fondamentales de la première période du développement ont été faites.

Stade 1. C'est le premier stade après la fécondation. Le protoplasme d'œuf est dispersé et remplit entièrement la membrane vitelline. La plupart des œufs pondus fraîchement sont à ce stade (Fig. 1).

Stade 2. C'est le stade auquel le protoplasme s'est contracté pour former un ellipsoïde. C'est à ce stade que les noyaux se divisent à l'intérieur de l'œuf (Fig. 2).

Stade 3. Stade du jeune blastème : à ce moment, les cellules polaires bourgeonnent à la surface postérieure de l'embryon. C'est à ce stade que les



noyaux terminent leur migration centrifuge vers la surface; le cytoplasme périphérique s'est transformé en une couche individualisée, le blastème (Figs. 3 et 4).

Stade 4. Stade du préblastoderme : c'est alors que les noyaux du blastème se divisent dans le cytoplasme périphérique ou dans la couche corticale. Mais, on ne voit pas encore les structures cellulaires caractéristiques du blastoderme à ce stade (Fig. 14).

Stade 5. La formation du blastoderme s'est accomplie et on observe clairement une couche unique de cellules à la surface (Fig. 5).

Stade 6. Stade de prégastrulation : la contraction secondaire de volume s'est produite dans la partie céphalique de l'embryon, en même temps, la

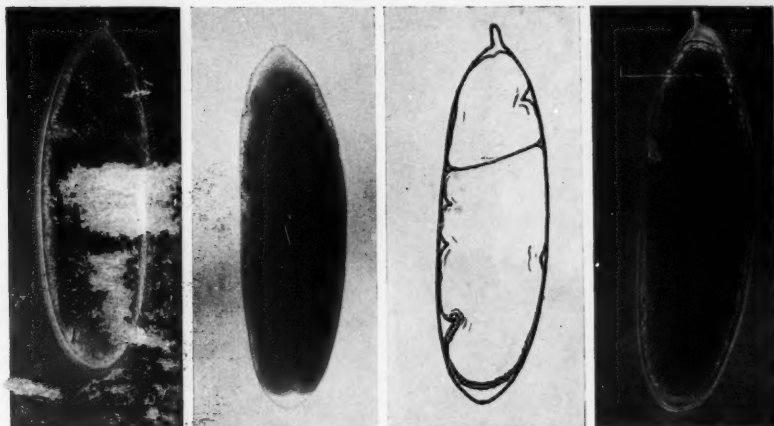


Fig. 6

Fig. 7

Fig. 8

Fig. 9

Fig. 6. Stade 7. Fig. 7. Stade 8. Fig. 8. Stade 8, schématiquement. Fig. 9. Stade 9.

Figs. 1—9. Diagramme standard du développement chez *D. virilis*. Les figs. 2, 3, 4, 5, 6 et 9 sont des photomicrographies en contraste de phase. La longueur de l'œuf, chez *D. virilis*, est de 0,5 mm en moyenne.

gouttière ventrale s'est formée le long de la ligne médiane dans le côté ventral (Fig. 16).

Stade 7. A ce moment, la gouttière céphalique s'est formée et la couche cellulaire postérieure, y comprise la masse des cellules polaires, commence son mouvement en avant vers le côté dorsal (Fig. 6).

Stade 8. La gouttière ventrale s'est approfondie et elle s'est prolongée vers le côté dorsal en transversant la partie postérieure; en même temps, quelques fissures transversales se sont formées (Photographie de la Fig. 7, schéma de la Fig. 8).

Stade 9. A ce moment, la bande germinale et l'invagination stomodéale se sont formées (Fig. 9).

Les stades qui prennent d'être décrits sont identiques tant chez *melanogaster* que *virilis*. Les stades ultérieurs ne seraient pas examinés dans le travail présent.

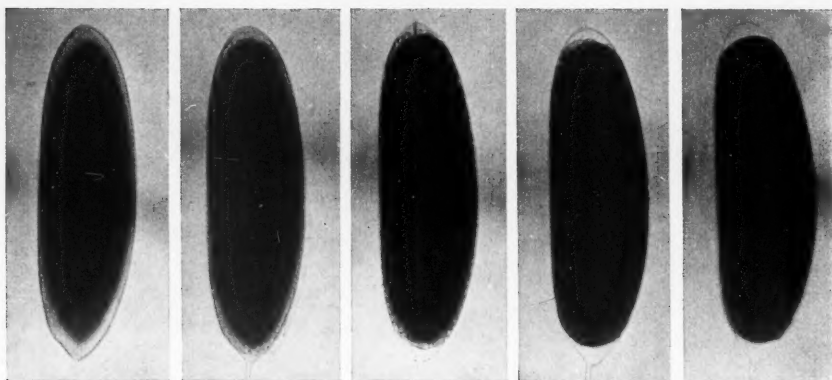


Fig. 10

Fig. 11

Fig. 12

Fig. 13

Fig. 14

Fig. 10. Contraction du protoplasme. Fig. 11. Jeune blastème. Fig. 12. Stade du blastème. Fig. 13. Blastème tardif. Fig. 14. Jeune blastoderme, stade 4.

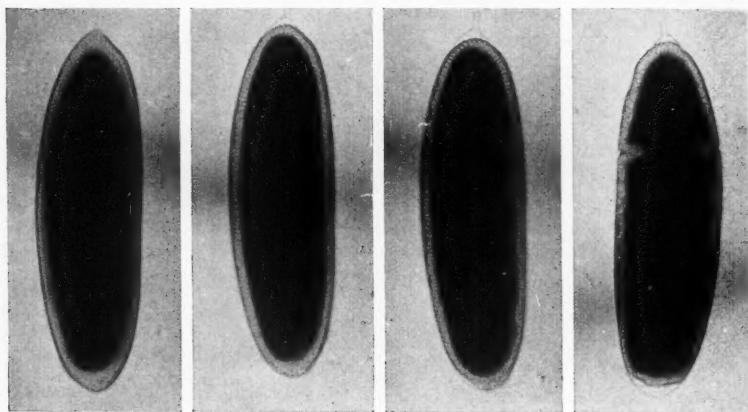


Fig. 15

Fig. 16

Fig. 17

Fig. 18

Fig. 15 Stade du blastoderme. Fig. 16. Blastoderme tardif ou prégastrulation, stade 6. Fig. 17. Formation des gouttières ventrale et céphalique. Fig. 18. Commencement du mouvement de la masse des cellules polaires.

Figs. 10—18. Variation du volume du protoplasme pendant la première période du développement chez *D. virilis* suivie sur un même œuf.

## II. Étude de la variation de volume du protoplasme pendant le développement (Graphiques I, II et III, et Figs. 10—18).

Observation I. Immédiatement après la ponte, le protoplasme remplit entièrement la membrane vitelline; mais, peu après, il se contracte et forme un ellipsoïde. Cette contraction est la première expression des mouvements protoplasmiques. Par la suite, le volume du protoplasme contracté augmente à nouveau et les cellules polaires font saillie. Après la formation de ces cellules, l'augmentation du volume protoplasmique progresse et il remplit à nouveau la membrane vitelline; c'est à ce moment que se forme la couche unicellulaire de cellules à la surface. Cependant, on ne peut distinguer immédiatement la structure cellulaire de l'embryon lorsqu'il a atteint son volume maximum et il y a un moment où la structure des cellules en périphérie reste obscure: c'est là un stade intermédiaire entre ceux du blastème et du blastoderme. Après la formation du blastoderme, aucune variation du volume de l'embryon ne se produit pendant au certain temps; mais bientôt, une nouvelle contraction du volume s'amorce accompagnée de la formation de la gouttière ventrale. Cette contraction porte uniquement sur la partie céphalique, sans atteindre les régions postérieures. C'est peu après la formation de la gouttière ventrale que la gouttière céphalique se forme.

La première contraction du protoplasme a lieu aussi chez les embryons létaux dépourvus de chromosome X; le protoplasme, après sa concentration, augmente de volume comme chez l'embryon normal et atteint un maximum. Mais, ni la projection des cellules polaires, ni la formation du blastoderme ne se produisent, bien que les noyaux de l'embryon létaux se divisent au stade où le volume diminue; mais ils ne pénètrent pas dans le cytoplasme périphérique, à quelques exceptions près. Lorsqu'ils pénètrent, leur colonisation se restreint à la moitié antérieure de l'embryon. La division des noyaux continue un instant dans le cytoplasme, qui a atteint son volume maximum; mais aucune différenciation de l'embryon ne se produit et le protoplasme se cytolysé bientôt. La cytologie de cet embryon létaux a été d'ailleurs étudiée en détails par Poulson (1940 et 1945).

La variation du volume du protoplasme lors de la contraction conduisant à la formation de la gouttière ventrale est indiquée sur les Figs. 10—18, d'après des photos au cours du développement d'un même œuf.

Observation II. Les variations du volume sont données dans les graphiques suivants, basées sur des observations qui ont été exécutées sur des œufs placés dans la solution de Ringer. Ils ont été mesurés toutes les cinq secondes avec un micromètre oculaire hélicoïdal.

La forme de l'embryon étant un ellipsoïde pendant la première période, les mesures ont été exécutées sur les longueurs *a* et *b* de la Fig. 19. Les

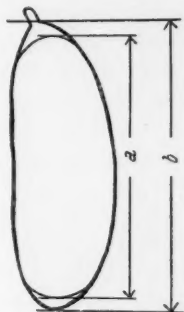


Fig. 19. La figure schématique qui indique le stade de la première contraction du protoplasme (vue latérale).

variations de *a* se rapportent à la direction antéro-postérieure (l'axe long de l'ellipsoïde); celles de *b* indiquent à la circonférence (l'axe court de l'ellipsoïde). La variation de *b* est presque nulle tant que l'embryon est enfermé étroitement par sa membrane vitelline rigide. Par conséquent, la variation de volume est principalement due aux changements de la longueur *a*; les lignes courbes indiquées dans les graphiques I, II et III, ne représentent donc que la variation de *a*.

Les résultats obtenus dans le cas des œufs fécondés sont indiqués par les lignes courbes dans le groupe A des graphiques. Plus de vingt embryons ont été mesurés pour ces observations qui ont été faites à 22° C. La plupart des embryons montrent la même tendance des lignes courbes; c'est pourquoi celles-ci n'ont été représentées ici que pour trois embryons de *D. virilis* et de *D. melanogaster*. Afin que l'on reconnaisse suffisamment l'augmentation et la diminution du volume lors de la projection des cellules polaires, une ligne courbe qui a été enregistrée à 15° C pour un embryon de *D. virilis* a été représentée dans le graphique II. Dans ces graphiques, le début de la projection des cellules polaires a été indiqué par la marque de « cp » et celui de la formation de la gouttière ventrale a été marqué « gv ».

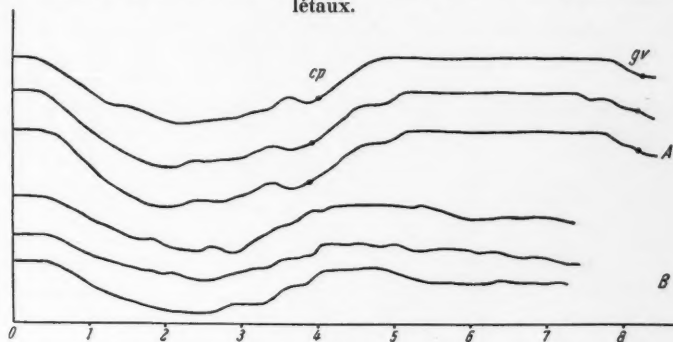
Les mêmes observations ont été exécutées ensuite des œufs vierges et des embryons létaux; les résultats sont indiqués dans les groupes B et C des lignes courbes des graphiques I et III. Plus de vingt embryons ont été étudiés dans ce cas, mais les graphiques de trois embryons seulement ont été reproduits ici. Comme on le voit dans les graphiques, les œufs vierges et les embryons létaux montrent aussi une période pendant laquelle le protoplasme se contracte, puis augmente. Mais dans l'œuf vierge, l'augmentation est ralentie et se produit en pente douce; le protoplasme ne remplit pas entièrement la membrane vitelline. Dans l'embryon létaux, l'augmentation du protoplasme se fait comme l'embryon normal: elle atteint un maximum et remplit toute la membrane vitelline (groupe C du graphique III). Mais, ni dans les œufs vierges ni dans les embryons létaux les cellules polaires et le blastoderme se forment; leurs protoplasmes se désagrègent bientôt graduellement.

Les observations ci-dessus permettent de tirer les conclusions suivantes: (1) Le protoplasme de l'embryon, après que l'œuf a été pondue, présente un stade initial de contraction. (2) Le volume du protoplasme augmente ensuite, tandis que les cellules polaires font saillie. (3) Immédiatement avant la projection de ces cellules, le protoplasme tend à diminuer légèrement de volume. (4) La formation du blastoderme s'achève pendant la période où le volume du protoplasme a atteint son maximum. (5) Le volume se réduit à nouveau lors de la formation de la gouttière ventrale, mais cette contraction se limite à la partie céphalique. (6) Dans l'œuf vierge ou l'embryon létaux, les mouvements initiaux de contraction et de dilation se produisent comme dans l'embryon fécondé; dans l'embryon létaux, le volume atteint même un maximum. Mais dans les deux cas, ni les cellules polaires, ni le blastoderme ne se forment.

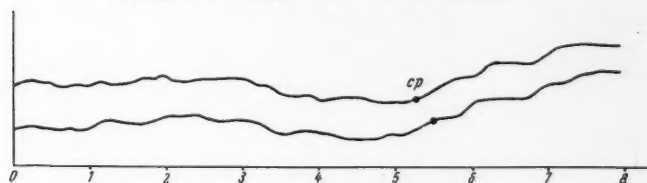
## Graphiques

Evolution de la variation du volume pendant le début du développement. Les variations de la longueur de *a* en fonction du temps sont portées en ordonnées (en échelle arbitraire) et les temps (en heures) en abscisses. Les indications « cp » et « gv » indiquent la première apparition des cellules polaires et de la gouttière ventrale respectivement.

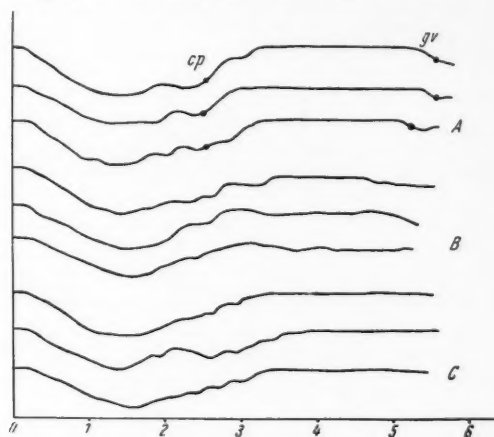
Groupe A : embryons fécondés; Groupe B : l'œufs vierges; Groupe C : embryons létaux.



Graphique I : Embryons de *D. virilis* à 22° C.



Graphique II : Embryons de *D. virilis* à 15° C.



Graphique III : Embryons de *D. melanogaster* à 22° C.



### Discussion des résultats

En ce qui concerne la contraction initiale du protoplasme, il semble que ce mouvement ne soit pas contrôlé par les noyaux ou les gènes puisqu'il se produit aussi bien dans l'œuf vierge ou l'embryon léthal que dans l'embryon fécondé. Il s'agirait là d'un phénomène qui tend à diminuer l'énergie libre de la surface du protoplasme qui conduit donc à une condition plus stable.

Le mécanisme de l'augmentation du volume du protoplasme demeure inconnu; cette augmentation, même si elle est faible, se produit dans l'œuf

vierge aussi bien que dans l'embryon fécondé; il faut en conclure que l'augmentation du protoplasme n'est pas encore contrôlée par les noyaux.

Passons à la discussion de la relation entre la variation du volume et la migration des noyaux; théoriquement, afin que les particules intérieures d'un système dispersé puissent se mouvoir à la périphérie, il faut qu'il se produise une réduction de leur concentration à la surface, donc une l'augmentation de volume. Effectivement, le volume du protoplasme se met à augmenter avant la projection des cellules polaires. Mais cette projection, d'après les observations sur des préparations fixées, ne se produit qu'après les noyaux aient fini leur migration centrifuge (Fig. 20). Si la migration des noyaux est liée à la variation de volume, il convient de donner une signification importante à deux petites augmentations de volume qui se



Fig. 20. Préparation d'un embryon de *D. virilis* fixé au mélange alcool-acide acétique et coloré à l'hématoxyline ferrique de Heidenhain. Les noyaux existent déjà dans la couche périphérique au stade 3, où les cellules polaires ont effectué leur première projection.

produisent immédiatement avant la projection des cellules polaires; or le protoplasme de l'embryon, quoique quelques oscillations de volume se produisent à ce moment, tend à diminuer dans l'ensemble avant la formation des cellules polaires.

Notons aussi que beaucoup de granules vitellins sont présentés dans le cytoplasme. Si le mouvement des inclusions cellulaires était dû à la différence de concentration à la surface ou à la variation du volume, les granules vitellins, tout comme les noyaux, devraient se mouvoir à la

périphérie au moment où le volume s'augmente. Or, en dépit de la migration centrifuge des noyaux, les granules vitellins s'arrêtent ou se retirent vers l'intérieur; pendant la période où il se produit une augmentation remarquable de volume (après la formation des cellules polaires), ils se concentrent au centre de l'œuf. Donc, bien que les noyaux et les granules vitellins aient des dimensions du même ordre de grandeur, leur comportement est opposé. De plus, dans l'embryon létalement dépourvu de chromosome X, les noyaux ne se meuvent pas à la périphérie, à quelques exceptions près, la variation de volume est cependant la même que dans l'embryon vivant. Il nous paraît donc impossible d'admettre que la migration centrifuge des noyaux résulte seulement des variations de volume.

La formation de la gouttière ventrale s'accompagne d'une décroissance du volume de l'embryon: on sait qu'il y a une corrélation possible entre la dépression de la surface et l'augmentation de la concentration à la surface; le phénomène décrit ci-dessus suggère la possibilité d'une telle corrélation. Cependant, puisque la surface de l'embryon en stade du blastoderme est formée par une couche unique de cellules, il reste à savoir si ce phénomène peut être expliqué mécaniquement de manière aussi simple, même si l'on admet que la force motrice à la formation de la gouttière ventrale existe dans la partie céphalique de l'embryon.

### Résumé

Les variations du volume du protoplasme pendant le développement ont été suivies chez *D. virilis* et *D. melanogaster*. Le protoplasme de l'œuf fraîchement pondu remplit la membrane vitelline; bientôt, il se produit une contraction de volume, et il se forme un ellipsoïde. Le protoplasme continue à sa contraction pendant quelque temps, puis il se produit à une augmentation de volume. La projection des cellules polaires se fait immédiatement après cette augmentation. Celle-ci est élevée après la formation des cellules polaires et le volume atteint alors un maximum. Pendant cette période, la formation du blastoderme s'accomplit. Ensuite, pendant la période de la formation de la gouttière ventrale, le volume de l'embryon se réduit à nouveau; mais cela la contraction se limite à la partie céphalique seulement. Dans l'embryon létalement nul X, la contraction et l'augmentation de volume se font comme dans l'embryon sain, bien que les noyaux n'exécutent pas leur migration centrifuge. La relation entre la variation de volume et la migration des noyaux est discutée.

### Travaux cités

- Hadorn, E., 1951: Developmental action of lethal factors in *Drosophila*. *Advances in genetics* 4, 53-85.  
Huettner, A. F., 1923: The origin of the germ cells in *Drosophila melanogaster*. *J. Morph. (Am.)* 37, 385-423.  
— 1924: Maturation and fertilization in *Drosophila melanogaster*. *J. Morph. (Am.)* 39, 249-265.  
Hill, D. L., 1947: Chemical removal of the chorion from *Drosophila* eggs. *Drosophila Information Service* 21, 89.

- Parks, H. B., 1935. Early embryology of *Drosophila*. The mechanics of gastrulation and its relationships to gynandromorphs found in *Drosophila melanogaster*. J. Hered. (Am.) 26, 239—240.
- 1936: Cleavage patterns in *Drosophila* and mosaic formation. Ann. Ent. Soc. (Am.) 29, 350—392.
- Poulson, D. F., 1937: The embryonic development of *Drosophila melanogaster*.
- 1940: The effect of certain X-chromosome deficiencies on the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. J. exper. Zool. 83, 271—325.
- 1945: Chromosomal control of embryogenesis in *Drosophila*. Amer. Naturalist 79, 340—363.
- Rabinowitz, M., 1940: Studies on the cytology and early embryology of the egg of *Drosophila melanogaster*. J. Morph. (Am.) 69, 1—50.
- Slifer, E. H., 1945: Removing the shell from living grasshopper eggs. Science 102, 282.
- Sonnenblick, B. P., 1950: The early embryology of *Drosophila melanogaster*. Biology of *Drosophila* 62—196.

Institut de zoologie, Faculté des sciences, Université de Kioto; Institut de biologie,  
Université de Kobé, Japon

## Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile

### II. Les éléments et les propriétés tinctoriales du protoplasme pendant la première période du développement

Par

Tadashi Imaizumi et Yoshikazu Kimoto

Avec 3 figures

(Reçu le 30 juin 1953)

#### Introduction

Les noyaux, aux premiers stades, sont enveloppés dans le cytoplasme et ils constituent l'îlot protoplasmique; ils se meuvent graduellement vers la périphérie de l'œuf où ils forment une couche unicellulaire de cellules. Le cytoplasme se compose de l'hyaloplasme et de nombreux petits granules dispersés dans celui-ci. Ces petits granules se groupent plus abondamment aux stades initiaux dans l'îlot protoplasmique; après la formation des cellules du blastoderme, au stade 5, la majorité des granules se concentrent à l'intérieur de la couche cellulaire périphérique (couche corticale intérieure) (Fig. 1); dans les cellules périphériques, une minorité seulement se distribue aux environs des noyaux. Les noyaux se trouvent donc dans un système dont la structure change au cours du développement. On sait aussi que les capacités de mouvement centrifuge des noyaux sont faibles dans les embryons létaux dépourvus de chromosome X (formula YY),

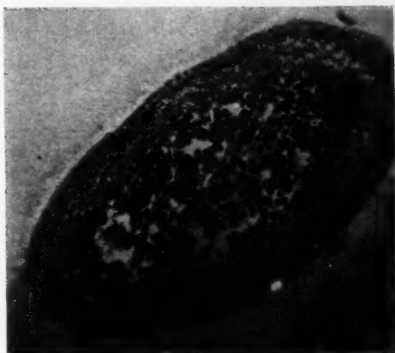


Fig. 1. Préparation faite au stade 4 (blastème tardif) chez *D. virilis*; coloration à l'hématoxyline ferrique de Heidenhain. On voit la couche corticale périphérique et la couche intérieure.

quoiqu'ils se divisent dans le cytoplasme (Poulson). C'est pourquoi nous avons étudié les affinités tinctoriales des éléments du protoplasme avec l'espoir de parvenir à préciser le mécanisme du mouvement centrifuge des noyaux.

### Matériel et méthodes

Les observations ont été exécutées sur des embryons des mouches sauvages de Kitakata-24 pour *D. virilis*, d'Oregon-R pour *D. melanogaster*, et sur des embryons létaux nullo X de *D. melanogaster*. Tous les embryons ont été déchorionnés avant l'observation. Trois stades : contracté (stade 2), blastème (stades 3 et 4) et blastodermique (stade 5) ont été choisis pour cette étude. L'alcool à 70%, le mélange d'alcool 70% et d'acide acétique glacial (15:1); et le mélange de formol, d'alcool 70% et d'acide acétique glacial (5:15:1) ont été employés comme fixateurs. Ces trois méthodes de fixation ont les avantages et les défauts suivants : La première permet une bonne coloration, mais le fixateur provoque une forte réduction au protoplasme. La dernière ne produit guère de réduction du protoplasme, mais elle rend à altérer la basophilie. L'alcool acétique est favorable tant pour la fixation que la coloration et c'est pourquoi il a été employé dans cette étude.

Les œufs ont été fixés après perforation de l'extrémité céphalique de l'œuf préalablement plongé dans le fixateur. L'hématoxyline ferrique de Heidenhain, l'hématoxyline de Delafield, la pyronine, le vert de méthyle, le Sudan III et la réaction de Feulgen ont été employés pour la coloration; de plus, la méthode de coloration discuté par Pischinger a été utilisée pour cette recherche (solution de bleu de toluidine et de fuchsine-S en concentration de  $\frac{1}{1000}$  M dans le tampon de McIlvain). Dans ce cas, les observations ont été faites après une coloration pendant 24 heures dans cette solution et inclusion dans la glycerine immédiatement.

De plus, des observations ont été faits sur des embryons qui avaient été écrasés par compression dans de la solution de Ringer, de la solution tamponnée de Sörensen et de McIlvain ou une solution de KCl.

### Observations

#### I. Les éléments qui constituent l'œuf.

La cellule se compose des noyaux, du cytoplasme et granules vitellins. Dans le cytoplasme, on peut distinguer clairement deux parties : de petits granules et l'hyaloplasme dans lequel ceux-ci se dispersent. En outre, comme décrits par Huettner (1923), il y a quelques granules dans la région polaire postérieure de l'embryon; ils sont bien teintés par l'hématoxyline et ils seraient incorporés plus tard dans les cellules polaires.

(1) Noyau. Le noyau au repos, au moment où le volume se réduit, manifeste l'aspect comme s'il est optiquement homogène et il donne très faiblement la réaction caractéristique de Feulgen; cependant en prophase, les chromosomes se teignent par la réaction de Feulgen. Au stade du blastème,



les noyaux au repos montrent un reticulum qui est teinté faiblement au Feulgen. Chacun des noyaux au repos dans les cellules du blastoderme possède une masse de chromatine ou amphinucléole [*« nucleolus »* de Sonnenblick (1947 et 1950)]; cette masse donne fortement la réaction de Feulgen et elle se localise à la partie la plus externe des noyaux fixés. Les noyaux ne se colorent pas par le Sudan III. La dimension du noyau est généralement de  $5\mu$  au repos. On sait, d'ailleurs, que tous les noyaux n'effectuent pas leur migration centrifuge et qu'un certain nombre d'entre eux s'arrêtent dans le cytoplasme intérieur où ils forment les noyaux vitellins ou vitellophags.

(2) Cytoplasme. L'hyaloplasme est acidophile et les petits granules basophiles; le premier se compose peut-être de particules ultramicroscopiques; les petits granules, au début, sont dispersés dans tout du cytoplasme, mais ils sont surtout abondants aux environs des noyaux. Ces granules présentent les particularités suivantes : leur dimension est généralement de  $0,5\mu$  et ils ont une forme globulaire qui ne change pas au cours de développement. La réaction de Feulgen et la coloration de vert de méthyle sont négatives; ils sont avoies de pyronine ou de bleu de toluidine; ils se colorent aussi par le Sudan III faiblement. Cette basophilie disparaît par traitement avec une solution de  $\text{HClO}_4$  10% en 24 heures à  $6^\circ\text{C}$  ou de ribonucléase cristalline; dans ces conditions, on peut observer clairement l'acidophilie de l'hyaloplasme. En raison de leur insolubilité dans l'acide acétique, ces granules ne peuvent être confondus avec les mitochondries et ils se distinguent des microsomes submicroscopiques par leur plus grande dimension. Ces observations indiquent que la majeure partie des acides ribonucléiques du cytoplasme est concentrée dans ces granules.



Fig. 2. Granules vitellins séparés (stade 2). Fixation à l'alcool chaud, et coloration par hématoxyline ferrique de Heidenhain. Comparez avec la Fig. 1.

(3) Granules vitellins. Ils sont d'une forme sphérique; leur dimension est variable, en moyenne de  $3-5\mu$ ; ils sont fortement l'acidophiles, et ils se colorent bien aussi par le Sudan III. Ils n'ont aucune affinité avec les noyaux et le cytoplasme, et se trouvent généralement dans une vacuole après fixation; ils seraient donc hydrophobes. Ces granules vitellins sont accompagnés de nombreux petits granules secondaires, qui peuvent en être séparés par une fixation à l'alcool chaud (Fig. 2).

*II. Les affinités tinctoriales de chacun des éléments après coloration double au bleu de toluidine et la fuchsine-S.*

(1) Noyau. Les noyaux au repos pendant les stades 3 et 4 ont été surtout étudiés. L'affinité tinctoriale est schématisée dans le tableau suivant.

Tableau 1. L'affinité tinctoriale des noyaux au repos chez *D. virilis*. La rangée supérieure représente la coloration à la fuchsine-S, l'inférieure représente la coloration au bleu de toluidine. La marque + indique une forte coloration à ce pH, celle (+) indique une coloration faible et celle — représente une coloration négative. Ces indications sont valable pour tous les tableaux suivants.

pH	2,2	2,4	3,0	3,4	4,0	4,4	5,0	5,4	6,0	6,4	
Stade											Fixateur
3	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	alcool et acide acétique
	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	
	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+	+	
4											alcool et acide acétique
	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	
	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	
chroma- tique	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	

Une observation exacte est impossible, car le noyau n'est pas homogène pratiquement et sa structure n'est pas simple. Lorsque la chromatine se localise dans la partie la plus extérieure des noyaux des cellules du blastoderme, on peut comparer les deux parties chromatique et achromatique; celui-ci (suc nucléaire) est acidophile et dans une large zone de pH, la coloration est intermédiaire entre le rouge et le bleu; cette zone est la même chez *D. melanogaster*, mais elle est plus claire que chez *D. virilis*. L'affinité tinctoriale du suc nucléaire chez *D. melanogaster* est représentée dans le tableau suivant.

Tableau 2. L'affinité tinctoriale de la partie achromatique dans le noyau au repos chez *D. melanogaster*.

pH	2,2	2,4	3,0	3,4	4,0	4,4	5,0	5,4	6,0	6,4	
Stade											Fixateur
4	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	—	—	alcool et acide acétique
	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	+	

(2) Cytoplasme. L'affinité tinctoriale du cytoplasme est indiquée dans le tableau suivant.

Tableau 3. L'affinité tinctoriale du cytoplasme au stade 2.

pH	2,2	2,4	3,0	3,4	4,0	4,4	5,0	5,4	6,0	6,4	
Espèce											Fixateur
<i>D. virilis</i>	+	+	(+)	—	—	—	—	—	—	—	alcool et acide acétique  alcool seule- ment
	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	
	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Embryon sain de <i>D. melano- gaster</i>	+	+	+	+	(+)	—	—	—	—	—	alcool et acide acétique
	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	
Embryon léta1 de <i>D. melano- gaster</i>	+	+	+	(+)	—	—	—	—	—	—	
	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	

L'affinité tinctoriale de l'embryon léta1 de *D. melanogaster* ne montre aucune différence par rapport à l'embryon sain. Le protoplasme est basophile en général, mais l'hyaloplasme et les petits granules coexistent; la basophilie de ces derniers peut être enlevée par la ribonucléase ou une solution de  $\text{HClO}_4$ , et on peut alors observer l'affinité tinctoriale de l'hyaloplasme seulement. Les résultats se trouvent dans le tableau suivant.

Tableau 4. L'affinité tinctoriale de l'hyaloplasme seul au stade 2.

pH	2,2	2,4	3,0	3,4	4,0	4,4	5,0	5,4	6,0	6,4	
Espèce											Fixateur
<i>D. virilis</i>	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	alcool et acide acétique
	—	—	—	—	(+)	(+)	+	+	+	+	
Embryon sain de <i>D. melano- gaster</i>	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	
	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	
Embryon léta1 de <i>D. melano- gaster</i>	+	+	+	+	+	(+)	—	—	—	—	
	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	+	

On voit que les propriétés tinctoriales de l'hyaloplasme ont une tendance à la ressemblance chez *D. melanogaster* et *D. virilis*. Et l'affinité tinctoriale de la couche corticale intérieure est plus inclinée vers le côté

alcalin chez *D. melanogaster* que chez *D. virilis*. Ce résultat est indiqué dans le tableau suivant.

Tableau 5. L'affinité tinctoriale de la couche corticale intérieure.

pH	2,2	2,4	3,0	3,4	4,0	4,4	5,0	5,4	6,0	6,4	
Espèce											Fixateur
<i>D. virilis</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	alcool et acide acétique
	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>D. melanogaster</i>	+	+	+	(+)	—	—	—	—	—	—	alcool et acide acétique
	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	

(3) Granules vitellins. Peu de variations de coloration ont été observées au cours de la première période du développement. Ce sont les éléments les plus acidophiles du protoplasme.

Tableau 6. La spécialité tinctoriale des granules vitellins.

pH	2,2	2,4	3,0	3,4	4,0	4,4	5,0	5,4	6,0	6,4	
Espèce											Fixateur
<i>D. virilis</i>											alcool et acide acétique
L'œuf ovarien	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—	
	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	
Stade 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+	
Stade 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	
Embryon sain de <i>D. melanogaster</i>											
Stade 5	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	
Embryon léthal de <i>D. melanogaster</i>											
Stade LBD <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	

<sup>1</sup> En ce qui concerne ce stade, voir le texte III.

### III. Les variations de l'affinité tinctoriale dans l'hyaloplasme au cours du développement.

L'hyaloplasme proche du noyau dans l'îlot protoplasmique présente des propriétés acidophiles plus marquées que dans les régions avoisinantes; ces

propriétés s'observent après coloration par les solutions tamponnée à pH 3,4, 4,0 et 4,4. Cette acidophilie se change à la basophilie dans la couche corticale périphérique et la cellule blastodermique, aussi que le montre le tableau suivant.

Tableau 7. Changement de l'affinité tinctoriale de l'hyaloplasme de la couche corticale périphérique chez l'embryon de *D. virilis*.

pH	2,2	2,4	3,0	3,4	4,0	4,4	5,0	5,4	6,0	6,4	Fixateur
Stade											
3	+	+	+	+	(+)	(+)	—	—	—	—	alcool et acide acétique
	—	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	
4	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	
	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	
5	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
	—	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	

Au stade du blastoderme, la majorité des petits granules est concentrée dans la couche corticale intérieure, mais un certain nombre des petits granules sont aussi contenus dans les cellules et ils sont distribués aux environs des noyaux, toutefois, il est obscur qu'ils sont les mêmes à ceux de l'ilot protoplasmique ou bien ils y ont été formés à nouveau.

Les observations ci-dessus permettent d'établir, pour chacun des éléments, à quel pH l'affinité tinctoriale change; voici un résumé de ces données.

Tableau 8. Valeur du pH auquel l'affinité tinctoriale change pour chaque élément qui constitue l'œuf.

Espèce	Stade	Noyau (au repos)	Cytoplasme			Granules vitellins
			Hyaloplasme	Petits granules	Couche corticale intérieure	
<i>D. virilis</i>	2		4,4	2,4-3,0	—	5,4-6,4
	4	4,0-5,4	3,4-4,4	2,4-3,0	—	6,0
	5	3,4-5,0			2,4	6,0
Embryon sain de <i>D. melanogaster</i>	2		4,4	3,4	—	5,0-5,4
	5	4,0-5,0			3,0-3,4	5,0-5,4
Embryon létaux de <i>D. melanogaster</i>	LBD		4,4	3,0-3,4	—	5,0-5,4



*IV. Coagulation de l'hyaloplasme et des petits granules en faisant varier le pH des solutions.*

L'hyaloplasme qu'on fait sortir dans le milieu ambiant par écrasement présente des images caractéristiques de coagulation quand la solution est remplacée par d'alcool ou une solution tamponnée. Les petits granules peuvent se disperser dans une solution de 0,0015–0,003 M de KCl : si on remplace celle-ci par des solutions de divers pH, on peut observer les figures caractéristiques de leur coagulation. Elles sont indiquées schématiquement dans la Fig. 3 et les résultats sont décrits ci-dessous.

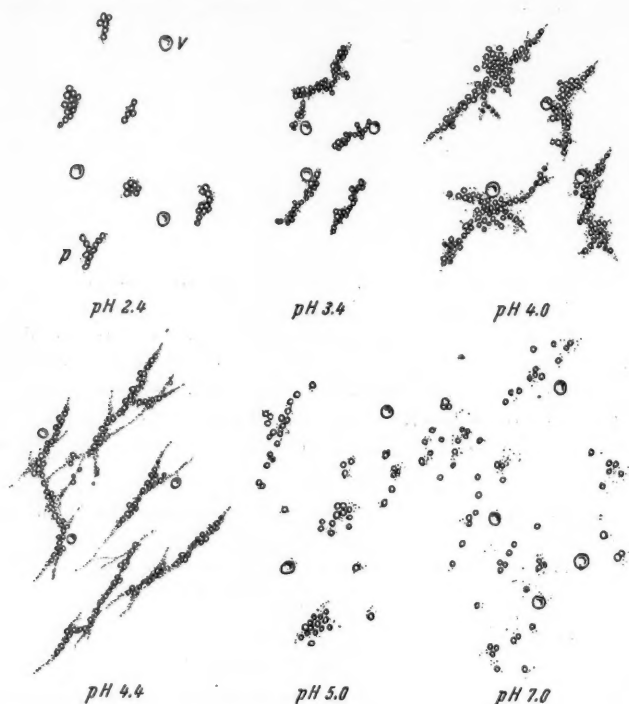


Fig. 3. Figures de coagulation à divers pH. *v* : granule vitellin; *p* : petits granules.

Les solutions tamponnées de Sørensen et de McIlvain donnent le même résultat et les observations ont été faites surtout avec les premières.

**pH 2,4.** Les petits granules flottent au début dans la solution, agités d'un mouvement brownien; bientôt ils sont assemblés en petits groupes et ils montrent une figure bacilliforme.

**pH 3,4.** Les petits granules, dès que la solution est remplacée par le tampon, cessent leur mouvement brownien et forment des groupes dont la masse est plus grande que dans le premier cas.

pH 4,0. Comme dans le cas précédent, mais la masse est plus grande et elle est quelque peu ramifiée.

pH 4,4. Quand la solution est changée, le cytoplasme est coagulé sous une forme fibroïde. Cet aspect provient peut-être de ce que l'hyaloplasme a été coagulé; les petits granules sont accolés à celui et ils forment un chapelet.

pH 5,0-6,0. Les petits granules se groupent en masse, comme au pH 3,4; cette masse n'indique pas l'aspect fibroïde observé à pH 4,4. Mais le degré d'attachement de chaque granule est plus lâche qu'à pH 3,4. Le mouvement brownien ne se manifeste pas dans ce cas.

pH 7,0. Les petits granules sont dispersés librement dans la solution; ils subissent le mouvement brownien et ils ne se groupent pas ensemble.

### Discussion

Il est impossible de tirer des conclusions définitives des observations ci-dessus, il est cependant possible de discuter deux problèmes: la relation existant entre le milieu ambiant et les éléments qui constituent la cellule, et l'affinité tinctoriale de chaque élément.

I. Les granules peuvent être distingués en deux sortes par rapport au milieu ambiant: hydrophiles et hydrophobes. Les observations ci-dessus indiquent que le noyau est hydrophile et le granule vitellin hydrophobe. Ce dernier, en préparation fixée, est toujours contenu dans vacuole sans entier en contact avec l'hyaloplasme. Cette vacuole est sans doute un artefact causé par le caractère hydrophobe du granule vitellin. Cette idée est confirmée par le fait que des lipides sont contenus dans les granules vitellins, mais qu'ils sont absents ou très rares dans le noyau. Bien que la dimension du noyau et les granules vitellins sont du même ordre, leur comportement est opposé pendant les premiers stades du développement, comme nous l'avons décrit dans le travail précédent. Ce fait est peut-être dû à une différence dans les caractères physico-chimiques de l'un et l'autre. Ces différences sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 9. Les différences des caractères du noyau et du granule vitellin chez l'embryon de *D. virilis*.

	Noyau	Granule vitellin
Dimension	généralement $3\mu$ (au repos)	$3\mu-5\mu$
Caractère	hydrophile	hydrophobe
Point minimum de fixation du colorant	pH 3,4-pH 5,0	pH 5,4-pH 6,0

II. D'après Reiss (1926), la différence des valeurs du  $pH_i$  (point minimum de fixation du colorant) et du pH est la réaction critique; sa valeur représente l'état de la charge libre du protoplasme.

Puisque le constituant principal de chaque élément du protoplasme est un ampholyte comme les protéines, sa charge libre défend de la concentration en ion  $H^+$  du milieu ambiant et, par conséquent, il existe un  $pH$  du milieu qui permet une dissociation égale des valences acide et alcalin. Dans ces conditions, la densité d'anions et de cations est à un minimum et, par conséquent, la fixation du colorant est aussi à un minimum. La zone où change la coloration décrite ci-dessus correspond peut-être à ce point. Mais, la coloration vitale et la coloration du tissu fixé sont très différentes, et le point minimum de fixation du colorant dans les tissus fixés ne représente pas nécessairement celui de la cellule vivante.

En ce qui concerne l'embryon létal dépourvu de chromosome X, on a vu que la zone minimum de fixation du colorant ne montre guère de différence quand on compare l'embryon létal à l'embryon sain. Dans l'œuf de la drosophile, le  $pH$  du protoplasme n'a pas encore jusqu'ici été mesuré pour les raisons suivantes : afin de mesurer le  $pH$  du protoplasme, il est nécessaire que la cellule soit en bon état; on sait que le  $pH$  du protoplasme varie très fort quand la cellule meurt ou a été blessée. La coloration vitale et la microinjection d'indicateurs sont impossible chez l'œuf de *Drosophila* à cause des caractères spéciaux de la membrane vitelline : l'élasticité, l'imperméabilité d'eau etc.<sup>1</sup>

Or, dans l'embryon létal, le mouvement centrifuge des noyaux vers la périphérie est imparfait; les considérations ci-dessus, avec les observations suivantes, donneraient une donnée précieuse sur les raisons pour lesquelles la migration des noyaux est anormale dans les embryons létaux. (1) D'après Poulson (1945), Boell et Poulson (1939) ont mesuré, à l'aide du ludion, la consommation d'oxygène de l'œuf létal : la respiration s'élève de façon normale au tout premier stade de développement; elle cesse alors de s'élever, si bien qu'elle tombe au cinquième du métabolisme du témoin. (2) Caspersson et Schultz (1938) ont mesuré les spectres d'absorptions ultra-violette des oocytes chez les femelles XXY et XX; ces auteurs ont trouvé que le protoplasme de la femelle XXY est plus riche en substances absorbant l'ultra-violette, qui sont principalement des acides nucléiques. Si on admet que ce fait est causé par la présence d'un Y supplémentaire, il est possible que l'embryon létal, qui possède la constitution chromosomale de YY, soit peut-être plus riche en acide nucléique que l'embryon normal.

### Résumé

Des recherches sur les propriétés tinctoriales des éléments qui constituent l'œuf ont été exécutées. Le protoplasme est composé de noyaux, d'hyaloplasme, de petits granules et de granules vitellins. Les petits granules ont les caractéristiques suivantes : leur dimension est généralement de

<sup>1</sup> La seule méthode qui laisse disparaître l'imperméabilité de la membrane vitelline consiste à tremper un moment l'œuf dans xylol ou chloroforme. Mais, un tel traitement empêche le développement ultérieur. Nous essayons cependant d'améliorer.

0,5  $\mu$  et leur forme est globuleuse. Leur forte basophilie peut être enlevée par une solution  $\text{HClO}_4$  10% en 24 heures à 6° C ou par la ribonucléase. Il est donc probable que la majeure partie des acides ribonucléiques du cytoplasme est concentrée dans ces granules. L'hyaloplasme dans lequel les petits granules dispersent est, au contraire, acidophile; mais cette acidophilie se change en basophilie dans les cellules blastodermiques. A ce stade, les petits granules sont concentrés dans la couche corticale intérieure en dessous des cellules du blastoderme. Enfin, l'affinité tinctoriale de chaque élément du protoplasme au cours du développement primaire chez l'embryon normal et létaux a été discutée.

#### Travaux cités

- Brachet, J., 1947: Embryologie chimique.
- Caspersson J., and J. Schultz, 1938: Nucleic acid metabolism of the chromosomes in relation to gene reproduction. *Nature* 142, 294—295.
- Erickson, O., K. B. Sax and M. Ogur, 1949: Perchloric acid in the cytochemistry of pentose nucleic acid. *Science* 110, 472—473.
- Huettnner, A. F., 1923: Origin of the germ cells in *Drosophila melanogaster*. *J. Morph. (Am.)* 37, 385—423.
- Imaizumi, T., et Y. Kimoto, 1951: Les structures de l'œuf dans le développement initial chez la drosophile (en japonais). *Jap. J. Genet.* 26, 248.
- — 1951: Cytoplasmic constituents of eggs in early developing stages, and their staining properties. *Drosophila Information Service* 25, 106.
- Naylor, E. E., 1926: The hydrogen-ion concentration and the staining of sections of plant tissue. *Amer. J. Bot.* 13, 265—275.
- Pischinger, A., 1926: Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. *Z. Zellforsch. usw.* 3, 169—197.
- Poulson, D. F., 1945: Chromosomal control of embryogenesis in *Drosophila*. *Amer. Naturalist* 79, 340—363.
- Reiss, P., 1927: Le pH intérieure cellulaire.
- Sonnenblick, B. P., 1947: Synchronous mitoses in *Drosophila*, their intensely rapid rate, and sudden appearance of the nucleolus. *Rec. Gen. Soc. Amer.* 16, 52.
- 1950: The early embryology of *Drosophila melanogaster*. *Biology of Drosophila* 62—196.

Institut de zoologie, Faculté des sciences, Université de Kioto, Japon

## Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile

### III. La variation de la charge électrique à la surface de l'œuf pendant le développement initial

Par

Tadashi Imaizumi

Avec 3 figures

#### Introduction

Des observations sur la variation de la charge électrique à la surface ont faites l'objet de cette étude. Les matériaux employés sont les œufs des mouches sauvages de Kitakata-24 chez *D. virilis*, d'Oregon-R chez *D. melano-*

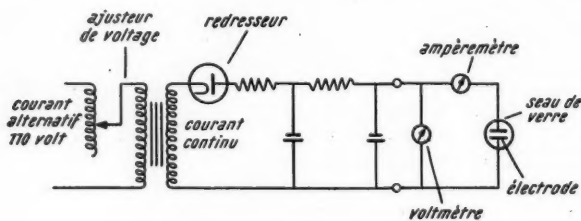


Fig. 1. L'appareillage des expériences.

*gaster* et le mutant à X-attaché chez *D. melanogaster*. Tous les œufs ont été déchorionnés préalablement et un champ électrique formé dans de la paraffine liquide a été employé. Voici un schéma de cet appareillage (Fig. 1). En ce qui concerne les stades du développement normal, le diagramme standard donné dans notre première étude a été adopté; pour les embryons létaux et les œufs vierges les stades suivants ont été adoptés :

Œufs vierges :

VC: C'est le stade où le protoplasme s'est contracté et a un ellipsoïde. Il correspond au stade 2 de l'embryon fécondé.

VD: C'est le moment où le protoplasme s'est cytolysé. Il correspondait à un stade entre 5 et 9 chez l'embryon fécondé, si l'œuf s'était développé.



Œufs létaux aux dépourvus de chromosome X (nullo X):

LC: C'est un mélange des premiers stades des embryons létaux et normaux, lorsque le protoplasme s'est contracté; l'embryon létaux de nullo X diminue en effet de volume, lui aussi, et il ne peut être distingué des normaux à ce stade.

LBD: C'est le stade où le protoplasme a atteint son volume maximum. Il correspond au stade 5 de l'œuf fécondé.

Les observations ont été exécutées sur des embryons placés dans de la paraffine liquide. La durée pendant laquelle l'embryon peut survivre a été observée; ces observations sont notées dans les tableaux suivants.

Tableau 1. Développement d'embryons qui ont été placés pendant dix minutes dans de la paraffine liquide au stade 2, puis reportés dans du Ringer.

incubés . . . . .	11
embryons anormaux, non incubés . . . . .	8
organogenèse incomplète . . . . .	7
aucun développement . . . . .	0
Total des embryons . . . . .	26

Tableau 2. Développement d'embryons qui ont été placés pendant trente minutes dans de la paraffine liquide au stade 3, puis reportés dans du Ringer.

incubés . . . . .	20
organogenèse complète, non incubés . . . . .	10
embryons anormaux, non incubés . . . . .	10
organogenèse incomplète . . . . .	10
aucun développement . . . . .	0
Total des embryons . . . . .	50

Ces montrent que l'embryon peut survivre normalement dans de la paraffine liquide pendant un moment; par conséquent toutes des observations ont été limitées à trois ou quatre minutes.

### Observations

Les observations ont été exécutées sur des embryons placés dans un petit seau de verre rempli de paraffine liquide pure. Quand le courant électrique direct a été mis entre deux électrodes de cuivre d'une surface de 5 mm<sup>2</sup>, le comportement des œufs a été observé avec un microscope horizontal. Quatre observations distinctes ont été faites.

Observation I. Les électrodes sont été placés à droite et à gauche à une distance de 5 mm (Fig. 2). Quand le matériel étudié, qui avait été laissé tomber de la surface de paraffine liquide, était arrivée au milieu des électrodes, un courant a été lancé et la réaction de l'œuf a été observée. Les œufs vivants, les œufs tués par de l'eau bouillante et le protoplasme extrait de l'œuf en pressant la membrane vitelline dans la

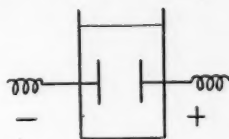


Fig 2. L'appareil par l'observation I.

paraffine liquide se meuvent tous vers la cathode. On sait que, chez l'œuf de la drosophile, on peut distinguer la partie céphalique de celle qui se trouve en arrière, parce qu'il y a une petite proéminence du côté de la tête; quand l'œuf a été soumis à une différence de potentiel, l'axe longitudinal est parallèle à la force électrique; dans ce cas, la direction vers laquelle la pointe de la tête de l'œuf est orientée n'a aucune relation avec la portion des électrodes.

Étant donné qu'une couche double électrique se forme à la surface par laquelle deux diélectriques différents sont en contact, une charge négative est donnée à la paraffine liquide et une charge positive à la surface de l'œuf.

Observation II. Quand un voltage est lancé à quelques œufs qui avaient été mis en une fois dans le seau rempli de paraffine liquide, ces œufs se placent en une rangée formant un pont entre les deux électrodes; à ce moment, le protoplasme de chaque œuf est incliné vers le côté de l'anode. Quoique le protoplasme puisse être tué par le courant électrique, il semble bien qu'il y ait, dans le protoplasme, beaucoup de particules chargées négativement.

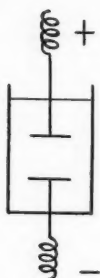


Fig. 3. L'appareil par lequel l'observation III.

Une observation d'électrophorèse a été alors exécutée: des électrodes de platine et le protoplasme d'un œuf broyé dans de l'eau distillée aux stades 2 et 5, ont été employés: dans ce cas, toutes les particules se meuvent vers l'anode: il en résulte que toutes les particules par lesquelles le protoplasme est constitué sont chargées négativement à l'eau.

Observation III. Les électrodes ont été disposées en haut et bas (Fig. 3) et la valeur du voltage pour laquelle un œuf qui a été mis sur l'électrode inférieure commence à se mouvoir a été mesurée. La distance entre les deux électrodes est de 1 mm et la valeur du voltage a été mesurée pour chaque œuf. Les résultats sont indiqués dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3. Valeurs du voltage pour lesquelles un œuf à chaque stade chez *D. virilis* commence à se mouvoir. Le signe entre parenthèses indique le signe de la charge dans l'électrode supérieure. La température est de 18° ~ 24° C.

Stade	Valeur moyenne (volt) et erreur probable	Limite des valeurs	Total des œufs
2 (+)	174 ± 0,7	150 ~ 200	151
3 (+)	187 ± 0,7	160 ~ 200	71
5 (+)	197 ± 0,5	170 ~ 220	152
6 (+)	185 ± 0,7	160 ~ 200	84
9 (+)	180 ± 0,7	160 ~ 210	89
2 (—)	171 ± 0,5	160 ~ 180	105
3 (—)	172 ± 0,4	160 ~ 180	113
5 (—)	176 ± 0,5	160 ~ 190	177
6 (—)	174 ± 0,4	160 ~ 190	151
9 (—)	174 ± 0,4	160 ~ 190	112

Stade	Valeur moyenne (volt) et erreur probable	Limite des valeurs	Total des œufs
VC (+)	173 ± 0,3	160 ~ 190	140
VD (+)	174 ± 0,3	170 ~ 180	102
VC (-)	170 ± 0,3	160 ~ 180	109
VD (-)	170 ± 0,3	160 ~ 180	97
2 tué (+)	173 ± 0,5	160 ~ 180	77
5 tué (+)	173 ± 0,7	160 ~ 190	69
9 tué (+)	173 ± 0,5	160 ~ 180	72
2 tué (-)	170 ± 0,3	160 ~ 180	87
5 tué (-)	172 ± 0,5	160 ~ 180	55
9 tué (-)	169 ± 0,4	160 ~ 180	72

Tableau 4. Valeurs du voltage pour lesquelles l'œuf à chaque stade chez *D. melanogaster* commence à se mouvoir. Le signe entre parenthèses indique le signe de la charge dans l'électrode supérieure. La température est de 18° ~ 23° C.

Stade	Valeur moyenne (volt) et erreur probable	Limite des valeurs	Total des œufs
2 (+)	164 ± 0,5	150 ~ 180	109
5 (+)	190 ± 0,6	170 ~ 210	99
9 (+)	177 ± 0,7	160 ~ 200	81
2 (-)	165 ± 0,6	150 ~ 180	95
5 (-)	170 ± 0,7	150 ~ 190	87
9 (-)	169 ± 0,5	150 ~ 190	110
VC (+)	166 ± 0,5	150 ~ 180	90
VD (+)	170 ± 0,5	150 ~ 190	100
VC (-)	164 ± 0,5	150 ~ 180	76
VD (-)	165 ± 0,5	150 ~ 170	90
LC (+)	169 ± 0,5	150 ~ 190	98
LBD (+)	190 ± 0,6	170 ~ 210	118
LC (-)	167 ± 0,5	150 ~ 180	98
LBD (-)	162 ± 1,0	150 ~ 190	80

En vue de vérifier si la différence entre ces valeurs est due à la différence du poids d'œuf à chaque stade, le temps requis pour que l'œuf de *D. virilis* franchisse une distance de 4,5 mm dans la paraffine liquide a été mesuré. Les résultats sont reproduits dans le tableau suivant.

Tableau 5. Vitesse de chute des œufs chez *D. virilis* dans la paraffine liquide. Température de 26° C.

Stade	Valeur moyenne (second) et erreur probable	Limite des valeurs	Total des œufs
2	7,4 ± 0,06	6,8 ~ 8,0	55
5	7,4 ± 0,04	6,8 ~ 8,0	46
7	7,4 ± 0,04	6,4 ~ 8,1	51
9	7,3 ± 0,04	6,3 ~ 8,0	52
2 tué	7,3 ± 0,04	6,3 ~ 8,2	47
5 tué	7,4 ± 0,04	6,4 ~ 8,0	60
9 tué	7,1 ± 0,04	6,3 ~ 8,0	52

On voit que la vitesse de chute est la même à chaque stade, par conséquent, il est clair que le poids d'œuf ne diffère pas suivant le stade : la différence des valeurs du voltage à chaque stade n'est donc pas due au poids d'œuf, mais à la densité de la charge de surface.

Notons encore les précisions suivantes : (1) La valeur du voltage à laquelle l'œuf réagit est élevée quand l'électrode supérieure est l'anode. (2) Quelle que soit la nature de la charge de l'électrode supérieure, l'œuf qui a été tué par de l'eau bouillante réagit à un voltage plus faible que l'œuf vivant. (3) Quand l'électrode supérieure est l'anode, la valeur du voltage à laquelle l'œuf réagit augmente quand le développement progresse : elle est à un maximum au stade 5, puis descend graduellement aux stades suivants; elle s'approche, au stade 9, de la valeur qu'elle avait au stade 2. (4) Quand l'électrode supérieure est la cathode, la variation des valeurs du voltage se retrouve à un certain degré, mais elle n'est pas plus remarquable que celle qu'on obtient quand l'électrode supérieure est l'anode. (5) La valeur du voltage à laquelle l'œuf vierge se déplace est presque égale à celle du stade 2 ou du stade 3 chez l'embryon fécondé. (6) L'embryon léthal nullo X au stade LBD réagit presque de la même manière que le stade 5 chez l'embryon vivant, bien que tous les noyaux de l'embryon léthal ne soient pas encore entrés entièrement dans le cytoplasme périphérique à ce moment.

Observation IV. Les électrodes ont été disposés en haut et bas avec un intervalle de 1 mm. Dans ce cas, le voltage a été lancé deux fois de suite à travers l'œuf, après une brève période de repos. La réaction de l'œuf a été observée et indiquée dans le tableau suivant.

Tableau 6. Valeurs du voltage pour lesquelles l'œuf commence à se mouvoir. L'électrode supérieure est l'anode.

(A) Réaction dans le premier champ électrique			Réaction dans le second champ électrique après un repos de 25 secondes après le premier		
Stade	Valeur moyenne (volt)	Limite des valeurs	Valeur moyenne	Limite des valeurs	Total des œufs
2	171 ± 0,7	150 ~ 190	164 ± 0,8	140 ~ 180	73
5	197 ± 0,9	180 ~ 210	175 ± 1,0	150 ~ 200	46
9	181 ± 0,6	170 ~ 190	167 ± 0,9	150 ~ 180	56

(B) Réaction dans le premier champ électrique			Réaction dans le second champ électrique après un repos de 85 secondes après le premier		
Stade	Valeur moyenne (volt)	Limite des valeurs	Valeur moyenne	Limite des valeurs	Total des œufs
2	174 ± 0,6	160 ~ 190	173 ± 0,5	160 ~ 190	60
5	196 ± 0,6	180 ~ 210	193 ± 0,9	170 ~ 210	59
9	179 ± 1,0	160 ~ 200	178 ± 1,0	160 ~ 200	40

D'après le tableau ci-dessus, il est clair que les valeurs dans le second champ électrique sont plus basses que celles observés dans le premier si la période de repos est courte; les valeurs dans le second champ s'approchent

des premières si le temps de repos est allongé. Ce phénomène signifie que la charge à la surface qui a été obtenue dans le champ électrique ne disparaît pas tout de suite après que le courant électrique a été arrêté.

### Discussion

Des observations sur la charge à la surface des œufs existent dans le cas des oursins et des amphibiens, mais ce phénomène n'avait pas encore été étudié chez l'œuf d'insecte.

Nous avons décrit dans le travail précédent les éléments du protoplasme de l'œuf de drosophile et leur mouvement : rappelons que, au stade où le protoplasme s'est contracté, les noyaux se divisent généralement dans la partie intérieure de l'œuf, ils sont enveloppés d'un cytoplasme riche en petits granules; les granules vitellins sont dispersés et isolés du cytoplasme. Lorsque le développement progresse, les noyaux, qui sont enveloppés dans l'îlot protoplasmique, se meuvent vers la périphérie; au contraire, les granules vitellins se réunissent à l'intérieur de l'œuf. Au stade de la formation du blastoderme, les noyaux, les petits granules et les granules vitellins sont stratifiés régulièrement : en une seule couche de cellules, y compris les noyaux, à la surface, une couche constituée par de nombreux petits granules au milieu, et un groupe de granules vitellins à l'intérieur.

Dans les cellules qui se sont rangées à la périphérie, la masse de chromatine, le suc nucléaire des noyaux et le cytoplasme des cellules sont aussi arrangés régulièrement : le noyau occupe la place la plus extérieure de la cellule et la masse de la chromatine se localise dans la partie la plus extérieure du noyau. Il existe donc un arrangement très régulier des éléments du protoplasme à ce stade du blastoderme chez l'embryon normal; c'est précisément à stade que la valeur de voltage qui agit sur l'œuf est la plus élevée.

Or, il est connu que les amino-acides et les protéines ont les caractéristiques physiques et chimiques suivantes : les amino-acides sont représentés comme des cations par la formule de  $H_3N^+ \cdot R \cdot COOH$  en solution acide et comme des anions par la formule de  $H_2N \cdot R \cdot COO^-$  en solution alcaline. Les protéines montrent essentiellement le même comportement que les amino-acides, mais elles en diffèrent principalement par la multiplicité de leurs groupes anion et cation. Donc, les protéines, tout comme les amino-acides, sont chargés électriquement.

On sait aussi (1) que dans une substance chargée électriquement, la condition électrique intérieure est représentée comme une charge de la surface, si elle est conductrice. (2) Si une molécule polaire est placée dans un champ électrique, elle peut être soumise à la polarisation diélectrique et, par conséquent, elle peut être orientée dans une direction définie. Des molécules non polaires typiques peuvent aussi devenir des dipôles quand elles sont placées dans un champ électrique.

Il semble que les règles physiques et chimiques ci-dessus sont aussi applicables à l'être vivant. D'ailleurs, il a été en observé par beaucoup

d'investigateurs de la physiologie cellulaire que le protoplasme de la cellule vivante est en général chargé électriquement. Puisque le protoplasme est constitué en grande partie par les protéines et les nucléoprotéines, la cellule est nécessairement chargée électriquement elle-même; il doit en résulter une charge à la surface de la cellule. Il est donc probable que les variations de la charge à la surface au cours du développement résultent des mouvements actifs causés par la synthèse, la décomposition et la transformation des substances internes de l'œuf qui sont chargés électriquement. Ces variations ne sont toutefois pas la cause, mais le résultat de ces mouvements actifs.

Il est impossible de tirer des conclusions définitives des données signalées ci-dessus; on peut cependant discuter les points suivants. Il semble que l'élévation de la valeur du voltage à laquelle l'œuf réagit représente la diminution de la charge à la surface de l'œuf; car si la densité de la charge à la surface est faible, l'œuf ne peut réagir qu'à un voltage élevé. Cela signifierait que la condition d'association des molécules des matériaux constituant le protoplasme intérieur est maintenue de façon plus stable. Le fait que la valeur du voltage est maximal au stade de la formation du blastoderme chez l'embryon normal, au moment où la condition de la distribution des éléments du protoplasme est réglée, plaide dans ce sens. En outre, la comparaison de l'embryon léthal au stade LBD avec l'embryon normal à stade 5, ne montre guère de différences entre les deux. Il faut en conclure que les mouvements métaboliques du protoplasme chez l'embryon léthal seraient exécutés jusqu'à ce stade, bien que les noyaux ne se déplacent pas régulièrement vers la périphérie.

### Résumé

Les variations de la charge à la surface ont été observées dans un champ électrique constant formé dans de la paraffine liquide pure. L'œuf est chargé négativement par rapport à la paraffine liquide. La valeur du voltage à laquelle l'œuf réagit est élevée au stade de la première contraction de volume, lors de la formation du blastoderme, atteint un maximum à ce stade et baisse ensuite lors de la formation de la gouttière ventrale. Au stade de la formation de la bande germinale, elle s'approche de la valeur initiale. La valeur du voltage à laquelle l'œuf vierge ou tué par l'eau bouillante réagissent est presque égale à celle du stade initial de l'embryon fécondé. Au stade où le volume du protoplasme atteint son maximum, la réaction chez l'embryon léthal de *D. melanogaster* est presque égale à celle trouvée au stade de la formation du blastoderme chez l'embryon normal.

### Travaux cités

Haurowitz, F., 1950: Chemistry and biology of proteins.

Imaizumi, T., et K. Nakamura, 1951: La charge électrique à la surface chez l'œuf de *Drosophila* pendant le développement initial (en japonais). Zool. Mag. 60, 53—54.

- Nakamura, K., and T. Imaizumi, 1949: Electric charge at the surface of developing embryos in *D. virilis*. *Drosophila* Information Service 23, 94.
- — 1950: Sur la charge électrique à la couche de surface chez l'embryon de *Drosophila* pendant le développement initial (en japonais). *Zool. Mag.* 59, 18.
- Sonnenblick, B. P., 1947: Synchronous mitoses in *Drosophila*, their intensely rapid rate, and sudden appearance of the nucleolus. *Rec. Gen. Soc. Amer.* 16, 52.
- 1950: The early embryology of *Drosophila melanogaster*. *Biology of Drosophila* 62—167.



## **Zusammenhang zwischen Austrocknungsresistenz und Frosthärte bei Immergrünen**

Von

**A. Pisek und W. Larcher**

Aus dem Botanischen Institut der Universität Innsbruck

Mit 4 Textabbildungen

*(Eingelangt am 6. November 1953)*

Hinsichtlich der Schädigung durch Kälte als solche unterschied schon Molisch (1896) zwischen Pflanzen, denen bereits Temperaturen knapp über 0° schlecht bekommen (vgl. darüber Seible 1939, Spranger 1941), und solchen, die erst schwachem oder starkem Frost, d. h. Temperaturen unter dem Eispunkt erliegen. Die letzteren kann man einteilen in Pflanzen, die erfrieren, sobald sich Eis in den Geweben zu bilden anfängt (eisempfindliche), und eisbeständige, die steif frieren können, ohne Schaden zu leiden, d. h. reichliche Eisbildung vertragen, ehe sie zugrunde gehen. Da pflanzliche Gewebe nicht reines Wasser, sondern Lösungen enthalten, liegt ihr Gefrierpunkt auf alle Fälle etwas unter 0°. Dazu kommt, daß organische Lösungen sich einige Grade unter ihren Gefrierpunkt unterkühlen lassen, ehe sie gefrieren. Auch die Kleinheit der Zellen fördert die Unterkühlbarkeit des Zellsaftes. Bei glücklichem Zusammentreffen aller dieser Umstände kann aber bestenfalls erreicht werden, daß die Säfte in den Geweben einige Grade unter Null auszufrieren beginnen; die Resistenz wird hierdurch also nur in bescheidenen Grenzen erhöht. Zunächst gefriert tracheidales und interzelluläres Wasser, wobei letzteres durch das Plasma hindurch der Vakuole so viel Wasser entziehen kann, daß das mit dem nunmehr konzentrierten Zellsaft im Hydratungleichgewicht stehende Protoplasma durch den Wasserentzug geschädigt wird. Frosttod wäre demnach eine Art Austrocknungstod (Kefler und Ruhland 1938, S. 160). Auf die Fähigkeit des Plasmas, Wasserentzug zu vertragen, kommt es also sehr an. Eisempfindliche vertragen offenbar nur schwache, eisbeständige Pflanzen überdauern hingegen mehr oder weniger weitgehende Entwässerung des Plasmas. Bei reichlicher Eisbildung mag sie zusammen mit rein mechanischen Schädigungen des Protoplasten, wie Verletzung durch Eiskristalle oder wohl auch Zerquetschen, zum Tod führen.

Bei den Blättern mancher Immergrüner nordischer Herkunft (*Ericaceen*) wechselt der Zustand mit der Jahreszeit zwischen eisempfindlich (Sommer) und eisbeständig (Winter).

Auch bei raschem Auftauen können Schäden entstehen. Iljin (1934) stellt sich diese in etwas gröberer Weise als Rupturen des Plasmas (Pseudoplasmolysen!) vor, Keffler und Ruhland (1938) vor allem als Folge disharmonischer Quellung der verschiedenen Plasmakomponenten.

Alle diese Veränderungen, mögen sie beim Gefrieren als auch Auftauen eintreten, finden letzten Endes im Protoplasma statt, d. h. die Frostresistenz muß in erster Linie eine plasmatische Resistenz sein. Außerdem noch aufgezeigte, auffallende zellphysiologische Veränderungen bei Frosteinwirkungen, von denen besonders aktive Erhöhungen des osmotischen Wertes des Zellsafts infolge Zuckerzunahme auf Kosten von Speicherstärke (Pisek 1950) sowie Ansammlung stark wasserbindender Kolloide im Plasma (Ullrich 1943, Levitt 1951) u. a. zumeist auf geänderte Fermentwirksamkeit hinauslaufende Umstellungen genannt werden, sind letztlich auch auf plasmatische rückführbar.

Wenn die Frosthärte tatsächlich — sei es auch nur zum Teil — auf der Fähigkeit des Plasmas beruht, Entwässerung zu vertragen, dann ist zu erwarten, daß ein Individuum im frostharten Zustand auch austrocknungsresistenter ist als im empfindlichen. Unter Austrocknungsresistenz verstehen wir im Sinne von Pisek und Berger (1938) und Höfler (1943) „die Fähigkeit“ (der vegetativen Organe), „starke Wasserverluste ohne Gefährdung des Lebens zu ertragen“ (Höfler 1943, S. 94). Sie ist die plasmatische Komponente der Dürre-resistenz, jener „komplexen Eigenschaft, die der Pflanze das Ausharren auf wasserarmem Standort und das Überdauern von Trockenperioden ermöglicht“ (Höfler).

Um die aufgeworfene Frage zu prüfen, knüpften wir an die Erfahrungen an, die am Innsbrucker Institut über die jahreszeitlichen Schwankungen der Frosthärte von Blättern der Bäume und Zwergsträucher an der alpinen Waldgrenze gesammelt wurden (Ulmer 1937, Pisek und Schießl 1947). Es ergab sich grundsätzlich ein beträchtlicher Unterschied zwischen Sommer- und Winterfrosthärte. Wenn irgend, konnten gerade bei diesen Arten faßbare Unterschiede der Austrocknungsresistenz erwartet werden.

## I. Material und Methode

### Material

Die Zweigproben der Nadelhölzer *Pinus Cembra* L. und *Picea excelsa* Link. sowie von *Rhododendron ferrugineum* L., *Loiseleuria procumbens* Desv. und *Arctostaphylos Uva-ursi* Spreng. als Vertretern der Ericaceenheide stammen wieder aus den unberührt im Naturzustand belassenen Beständen des Alpengartens der Universität auf dem Patscherkofel (1980 m ü. d. M.) bei Innsbruck, woher sie schon seinerzeit von Ulmer (1937) und Pisek und Schießl (1947) bezogen wurden.

*Pinus Cembra* und *Picea excelsa*, die beiden Nadelbäume, die hier untersucht wurden, stehen unmittelbar an der Waldgrenze; *Pinus Cembra*

wurzelt auf einem leichten Geländerücken und ist deshalb dem Föhn stärker ausgesetzt als die unter einem Gefällsbruch am Unterrand des Alpengartens stehende gedrungene *Picea* von ausgesprochenem Baumgrenzencharakter. Die *Rhododendron-ferrugineum*-Sträucher des ausgedehnten Bestandes, deren wir uns bedienten, besetzten den Rand einer Schneemulde, waren also relativ exponiert, weshalb sie wintersüber bei Föhn mit periphersten Zweigen häufig aus dem Schnee ragten und zurückfroren. Das *Loiseleuria*- und *Arctostaphylos*-Material wurde den vielfach schneefrei geblasenen Flecken außerhalb der Mulde entnommen. Die Proben wurden mit der Patscherkofelseilbahn zu Tal befördert und in kühlem Raum sofort bearbeitet, um unkontrollierbare Einflüsse irgendwelcher Art (Gefahr der Enthärtung im Winter in geheizten Räumen) zu vermeiden.

Außer den alpinen Immergrünen zogen wir noch einen stattlichen aufrechten Busch von *Hedera Helix* L. nördlich des Gewächshauses im Botanischen Garten zu Versuchen heran, um wenigstens einen Vertreter anderer Verbreitung (Boreo-meridional ozeanisch, Meusel 1943) kennenzulernen. Die Form des Busches bewirkt, daß sich im Winter der Schnee als Haube sammelt, während untere Partien, woher regelmäßig die Probeblätter entnommen wurden, frei bleiben. Es wurden nur ganzrandige der sogenannten Alters- oder Sonnenform benützt, nachdem sich in orientierenden Versuchen erwiesen hatte, daß im allgemeinen gleich alte, etwa gleich große, ganzrandige Blätter untereinander vergleichbarere Werte und bessere Resultate geben als die geteilten, die stärker individuell variieren.

### Methode

Entsprechend der Unterscheidung zwischen Austrocknungsfähigkeit des Protoplasmas und der Austrocknungsfähigkeit der Zelle als Ganzem, die Höfler (1943) unter Berücksichtigung der Studien Iljins (1927, 1930, 1933, 1935) über den Zelltod bei Wasserverlust getroffen hatte, sollte eine Methode angewendet werden, die die Austrocknungsfähigkeit des Protoplasmas zu messen gestattet. Iljin vertritt in seinen Arbeiten die Ansicht, der Protoplast der höheren Pflanzen werde beim Austrocknen dadurch geschädigt, daß die äußere Plasmagrenzschicht an den wenig elastischen und überdies mit Nachbarzellen mehrfach verbundenen Zellwänden haften bleibt, während das restliche Plasma der sich zusammenziehenden Vakuole folgt, wodurch es zu groben Zerreißen im Plasmagefüge kommen kann. Ähnliches geschieht nach Iljin bei unsachtem Wiederaufsättigen: Die Zellwand quillt als erstes, sie erlangt wieder ihre frühere Ausdehnung, das schwerer quellbare Plasma bleibt zurück; es bietet sich das Bild einer Plasmolyse („Pseudoplasmolyse“, Iljin 1934). Im Plasma selbst sättigen sich die verschiedenen Kolloide ungleich schnell auf, wobei innere Zerstörungen auftreten, die den Zelltod im Gefolge haben (Ullrich 1943, S. 178).

Solcherlei mechanischen Schädigungen des Plasmas kam Höfler (1943) bei seinen Austrocknungsresistenz- und Abhärtungsversuchen an einschichtigen Jungermannialenblättchen aus dem Wege, weil sich gezeigt hatte, daß

die Zellmembranen dieser Lebermoose dank ihres spezifischen Feinbaues (Höfler 1950) sehr elastisch, und vor allem auf Grund der Einschnittigkeit einzigartig beweglich, beim Welkevorgang den schrumpfenden Protoplasten gut folgen, weshalb die Gefahr eines Losreißen des Plasmas ausgeschlossen ist.

Der Umstand, daß die Versuche über das ganze Jahr auszudehnen waren, also bei den verschiedenen, jeweils am Standort herrschenden Temperaturen durchgeführt werden mußten, zwang uns, von der Höfler'schen Versuchsanordnung mit Kammern abnehmender Luftfeuchtigkeit Abstand zu nehmen. Wir mußten uns damit begnügen, die abgetrennten, ganzen Blätter und Nadeln langsam austrocknen zu lassen, wie dies Oppenheimer (1952) eingeführt hat und im Laufe der Zeit vielfach mit Erfolg geübt wurde (Pisek und Berger 1958, Rouschal 1958, Höfler, Migsch und Rottenburg 1941, Arvidsson 1951).

Streng genommen, wird durch diese Art der Prüfung die Austrocknungsresistenz der Zelle und nicht die des Protoplasmas ermittelt. Innerhalb gleichmäßigen Materials einer Spezies auftretende jahreszeitliche Änderungen können aber ohne Bedenken als Änderungen der Austrocknungsresistenz des Protoplasmas gewertet werden. Sind es doch bei peinlicher Auswahl möglichst gleichgestalteter, ausgereifter Blätter stets gleicher Herkunft und Exposition immer gleichartige Zellen, die vom Winter auf den Sommer keine wesentlichen Form- und Größenveränderungen erfahren.

Die abgenommenen Blätter und Nadeln (nie ganze Triebe) wurden ohne vorherige Aufsättigung in freier Atmosphäre im Schatten austrocknen gelassen oder winters zur Beschleunigung des Wasserverlustes in Exsikkatoren über konzentrierte Schwefelsäure gebracht, die im Freien in einem Wetterhäuschen aufgestellt waren. Aufsättigung vor Beginn des Versuchs unterblieb deshalb, weil besonders zur kalten Jahreszeit die natürliche Frosthärte dadurch vermindert oder gar aufgehoben worden wäre (vgl. Pisek und Schiefl 1947). Ein Teil der Blätter wurde als „Wägeprobe“ in — der Austrocknungsgeschwindigkeit angepaßten — Zeitabständen gewogen, ein zweiter Teil gleichartiger Blätter diente als „Parallelprobe“, die nicht gewogen wurde, zur Feststellung eingetretener Schäden. Die Parallelprobe enthielt bezüglich Wasserverlust immer einige „Vorläufer“ und „Nachzügler“ gegenüber dem Durchschnitt, so daß sich mit großer Genauigkeit das Vergleichsblatt zu einem fraglich geschädigten Blatt der Wägeprobe finden ließ. Diese Testblätter kamen nun in Schalen mit Wasser bis zu ihrer vollständigen Aufsättigung bzw. Aufquellung, worauf sich Schadensflecken im Sommer stets sehr deutlich, im Winter meist schlecht, je nach Pflanzenart verschieden, zu erkennen gaben. In solchen Zweifelsfällen mußte die Diagnose auf Grund mikroskopischer Schnitte durch die auf Schaden verdächtigen Blatteile gestellt werden. Wegen der Zähflüssigkeit des Protoplasmas und seines Haftens an der Wand, Eigenschaften, die sich im Winter allgemein, vornehmlich aber bei den Koniferennadeln störend bemerkbar machten, ließ sich einfache Plasmolyse nur selten zum Nachweis lebender Zellen verwenden. Doch bewährte sie sich nach Vitalfärbung mit Neutralrot sehr bei Fichtennadelquerschnitten; plasmolysierte Zellen der Fichtennadeln

sind selbst im Winter daran gut zu erkennen, daß die Farbintensität des vorher gespeicherten Neutralrot deutlich zugenommen hat. Bei den Ericaceen, auch bei der Zirbe, versagt das Verfahren, weil Zellsaftbestandteile (wohl Gerbstoffe) die Vitalfarbstoffe ausfällen. Bei diesen Objekten lieferte das Fluoreszenzmikroskop immer klare Übersichtsbilder, worüber an anderer Stelle ausführlicher berichtet wird (Larcher 1953). Hier sei nur kurz bemerkt, daß die Blattzellen aller unserer Versuchsobjekte sich durch Vakuoleneigenfluoreszenz auszeichnen. Da der fluoreszierende Stoff im Zellsaft gelöst ist (durch Plasmolyse leicht nachweisbar), liefert sein Austreten aus der Zelle und das damit verbundene Verlöschen der Zellsaftfluoreszenz ein sicheres Anzeichen für die Zerstörung der Semipermeabilität des Plasmas. Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieses „Eigenfluoreszenztests“ zur raschen und übersichtlichen Unterscheidung lebender von toten Zellen ist allerdings, daß alle lebenden Zellen tatsächlich fluoreszieren. Die Voraussetzung war für das Mesophyll bei allen untersuchten Arten erfüllt<sup>1</sup>. Meist genügte für die Schadensfeststellung und -abschätzung ein rascher Blick durchs Fluoreszenzmikroskop bei schwacher Vergrößerung ohne jegliche Behandlung des Schnittes; in den seltenen Zweifelsfällen erlaubte Plasmolyse mit einem nicht fluoreszierenden Hyper-tonikum (Glycerin) unter dem Fluoreszenzmikroskop sichere Diagnose.

Es ist eine alte Erfahrung, daß zunächst alte Blätter, dann die ausgereiften jüngeren und zuletzt Knospen der Trockenheit zum Opfer fallen. Schon Irmscher (1912) hat diese Absterbefolge sehr genau an Laubmoosen verfolgt. Auch in unseren Austrocknungsversuchen erwiesen sich die unentwickelten und die überalterten Blattorgane von Immergrünen weniger resistent als gut ausgereifte ein- bis zweijährige. Wie bei wachsendem Wasserverlust die Schäden an der Pflanze von den alten Blättern zu den Knospen fortschreiten, so wird auch das Einzelblatt bei zunehmender Austrocknung nicht sofort als Ganzes abgetötet, sondern sukzessiv, d. h. die Blattzellen sterben hauptsächlich gruppenweise, was teils von den Nerven, teils vom Rande, nicht selten auch von inselartig über die ganze Blattspreite verteilten Bezirken ausgeht.

Erschienen nun die ersten Schäden, so wurden die Versuche nicht sofort abgebrochen, sondern fortgesetzt, bis die Probe vollkommen der Austrocknung erlegen war, bevor sie in der üblichen Weise bei 105° C getrocknet wurde. Auf diese Weise war es möglich, mehrere Fixpunkte herauszugreifen.

Zuerst sterben die empfindlichsten Blattareale; wir nennen das mit Höfler, Migsch und Rottenburg (1941) den „kritischen Punkt“. In Wirklichkeit handelt es sich um einen engen Bereich, der jenen Zeitpunkt im Austrocknungsverlauf bedeutet, bei dem allererste, für das Blatt weiters nicht verderbliche Schäden (unter 1–2%) zum Vorschein kommen. Da bei

<sup>1</sup> Im allgemeinen fluoreszieren die Vakuolen im Mesophyll entweder bläulich oder aber weißlich; bei den Ericaceen finden sich hingegen im selben Schnitt sowohl gleißendhell weißlich bis gelb fluoreszierende als auch schwach mattblau leuchtende Zellen. Man muß die letzteren natürlich mitberücksichtigen!



unseren Untersuchungen eine Aufsättigung der frischen Pflanzen unterbleiben mußte, wird der kritische Punkt im folgenden nicht wie von Höfler, Migsch und Rottenburg als Defizit, sondern als „kritischer Wassergehalt“, d. i. als der Wassergehalt im kritischen Punkt in Prozenten des Trockengewichtes ausgedrückt (in den Diagrammen durch Punkte markiert). Vor Erreichen des kritischen Wassergehaltes gelangen die Proben in einen „kritischen Bereich“, angedeutet durch allererste vereinzelte punktförmige Schäden auf den empfindlichsten Blättern und nach oben hin begrenzt durch die letzte Messung, bei der noch alles gesund gefunden wurde (Kreise). Nach Unterschreiten des kritischen Wassergehaltes wird unter allmählicher Zunahme der Schäden ein Stadium erreicht, bei dem etwa 10% der Blätter bzw. der Blattfläche (Dreiecke! Entspricht dem subletalen Defizit, Oppenheimer 1932, S. 190) der Austrocknung zum Opfer gefallen sind. Schließlich leben nur mehr die resistenteren zwei Drittel der Blätter bzw. Blattzellen (Marke X, „Drittelschädigung“). Kritischer Wassergehalt und Wassergehalt bei Drittelschaden markieren also die Austrocknungsresistenz einerseits der empfindlicheren, anderseits der Mehrheit der resistenten Zellen eines Blattes.

## II. Temperatur- und Niederschlagsverhältnisse während der Versuchsdauer

Zu Beginn der Versuche um die Jahreswende 1949/50 und im Jänner 1950 herrschte strenge Kälte (Abb. 2, Patscherkofel: absolutes 2 m-Luftminimum — 18° C; Innsbruck: — 16° C, beide absolute Minima des Winters 1949/50). die wegen der Schneearmut im Jänner und Februar die Vegetation besonders stark in Mitleidenschaft ziehen konnte, zumal die zweite Jännerhälfte und der ganze Februar föhnreich waren. Erst das zweite und dritte Monatsdrittel des April brachten am Patscherkofel größere Schneefälle, die größten des ziemlich schneearmen Winters. Ab Ende April stieg sowohl im Tal als auch in der Höhe die Temperatur rasch an, so daß sich im Mai die Minima auf dem Patscherkofel um — 2° hielten, in Innsbruck nie mehr zum Eispunkt absanken. Trotz seiner Niederschlagsarmut kann der Mai am Patscherkofel als der feuchteste Monat gelten, denn zu dieser Zeit schmilzt alljährlich die Schneedecke ab, was bis in die ersten Juniwochen fortdauert. Im Tal schwanden die letzten Schneeflecken bereits Mitte April. Ein warmer, regenarmer Juni und ein heißer Juli folgten. Mit dem sehr feuchten September, der auf dem Patscherkofel schon fünf Frosttage und Minima bis zu — 4° brachte, setzte an der Waldgrenze ein auffallend kühler Herbst ein. Ende des ebenfalls kalten Oktober lagen am Patscherkofel einige Dezimeter Schnee, die den bis zu 10 cm Tiefe stark abgekühlten Boden weiterhin gefroren hielten. Auf dem Patscherkofel und in Innsbruck fiel nun die Lufttemperatur während des recht trockenen Dezember schnell ab und erreichte kurz vor Weihnachten das Winterminimum (Patscherkofel — 16° C, Innsbruck — 18° C). Mitte Jänner 1951 traf das lange ausgebliebene Tief ein und brachte Schnee, der infolge der bis zum Aprilanfang nur kurz unterbrochenen Niederschläge zu wahren Massen anwuchs. Im März lagen

die Temperaturminima noch sehr tief, und auch später hielt das Frühjahr nur sehr zaghaft seinen Einzug. So sind noch im Mai auf dem Patscherkofel Minima von  $-4^{\circ}\text{C}$  (gegenüber  $-1^{\circ}$  bis  $-2^{\circ}\text{C}$  im Mai 1950) und nicht nur genau doppelt so viele Frosttage wie im Vorjahr, sondern auch drei Eistage zu verzeichnen. Der Juni war in Innsbruck der wärmste Monat mit dem Jahresmaximum, dem Patscherkofel brachte er noch einen Frosttag, blieb dort also kühl. Ausgiebiger Juliregen hatte die Temperaturen gedrückt, so daß erst im August auf dem Patscherkofel die Lufttemperatur auf ihr Jahresmaximum ansteigen konnte. Was Frühjahr und Sommer an Wärme entbehrt hatten, kam besonders am Patscherkofel dem trockenen und ziemlich warmen Herbst zugute. Auf die beiden fast niederschlagsfreien Monate Oktober und November folgte mit mäßigen Schneefällen eine ausgesprochen winterliche, kalte Jahreswende.

Als charakteristisch für die Versuchsperiode sind demnach hervorzuheben: Der frühe Kälteeinbruch im Nachsommer 1950, der Schneereichtum des Spätwinters 1950/51 und vor allem der verzögerte Frühlingseinzug und Sommerbeginn 1951 infolge der langanhaltenden Kälte.

### III. Ergebnisse

#### Der Jahresgang der Austrocknungsresistenz bei den einzelnen Arten

Vor- und zweijährige Nadeln von *Pinus Cembra*, die während der an der alpinen Waldgrenze mit den beiden Sommermonaten Juli und August zusammenfallenden Triebperiode gegen Austrocknung — und, wie wir aus Ulmer (1937) und Pisek und Schiefl (1947) wissen, auch gegen Frost — am empfindlichsten sind, beantworteten erste herbstliche Nachtfröste im Laufe des September mit deutlicher Steigerung ihrer Widerstandsfähigkeit auch gegen Entwässerung (Abb. 1). Anfangs bis Mitte Oktober gefundene Austrocknungsresistenz (kritischer Wassergehalt: 80%, Wassergehalt bei Drittschaden: 60% des Trockengewichtes) kommt dem winterlichen Höchststand (kritischer Wert: 70%, Drittschaden: 53%) schon außerordentlich nahe. Auf diesem verharrend, überdauert die Zirbe die strengen Monate November bis Februar. Ab März stellt sich allmählich größere Aktivitätsbereitschaft auf Kosten der Resistenz ein, was sich weit ins Frühjahr hinauszieht, wie auch die Erwärmung der Luft und vor allem der obersten Bodenhorizonte nur sehr langsam fortschreitet. Im Mai, ja sogar noch im Juni, sind die Blätter widerstandsfähiger als im Hochsommer, obwohl die auf dem Patscherkofel um diese Zeit auf ihrem Höhepunkt stehende Schneeschmelze ergiebigsten Wassernachschub gewährleistet. Nur die immer wiederkehrenden Nachtfröste (auf dem Patscherkofel 7 Frosttage im Mai 1950 und 14 im Mai 1951), die dem Plasma völliges Aufgeben seines Resistenzzustandes nicht erlauben, können eine Erklärung hierfür sein.

Die Jahresschwankung der Austrocknungsresistenz stimmt im wesentlichen völlig mit der jahreszeitlichen Änderung der Frosthärte, wie sie uns durch Ulmer (1937) und Pisek und Schiefl (1947) bekannt worden ist, überein. Beide Kurven machen die Wellenbewegung konform mit.



Bei *Picea excelsa* schwankt der Wassergehalt am kritischen Punkt, dessen Unterschreitung erste Schäden im Gefolge hat, mit geringerem Jahresauschlag als bei 30% Schaden. Dies hat seine Ursache darin, daß bei der Fichte nicht nur im Sommer, sondern auch im Winter allererste Schäden sehr früh, d. h. bei noch recht hohen Wassergehalten auftauchen. Verfolgt man hingegen, bei welchem Wassergehalt im Lauf des Jahres das empfindlichere Drittel der Nadeln jeweils zugrunde geht, so findet man deutlichst alle bei der Zirbe beobachteten Merkmale: Sommerminimum,

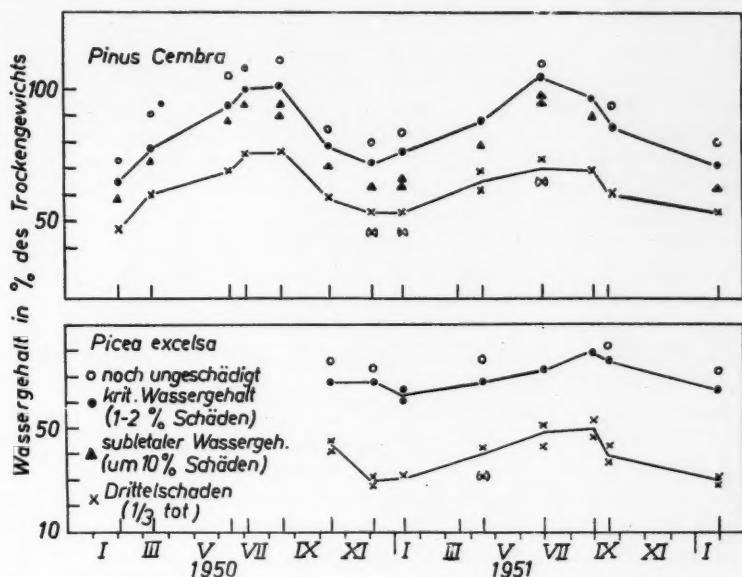


Abb. 1. Jahresgang der Austrocknungsresistenz vor- und zweijähriger isolierter Nadeln von *Pinus Cembra* und *Picea excelsa*.

Wintermaximum der Resistenz, ausgiebige Resistenzzunahme im Herbst und langsamer Verlust im Frühling.

Zur Feststellung des Jahresperiodismus der Austrocknungsresistenz ist es übrigens gar nicht notwendig, den Resistenzgrad zu bestimmen. Schon im Austrocknungs- und Schadensbild kommen Unterschiede zwischen Sommer- und Winterzustand der Blätter klar zum Ausdruck. Diese seien nur für zwei der untersuchten Arten beschrieben: Bei *Pinus Cembra* verlieren im Sommer die dunkelgrünen, lackartig glänzenden, dreikantigen Nadeln bald ihren Turgor, die Nadeln werden weich, schlaff, soweit das im Rahmen ihres Stützgewebes möglich ist, verlieren alsbald ihren Glanz und ihr Grün stumpft ab. Als äußerlich sichtbares Zeichen der Volumsverminderung fallen die ehemals prall konvex vorgewölbten Seitenflächen der Nadeln ein, so daß sich als Querschnittsbild ein dreizackiger Stern ergibt. In diesem

Zustand beginnen sich die Nadeln der Länge nach etwas einzuziehen, häufig auch um ihre Längsachse schraubig zu verdrehen. Gleichzeitig deuten meist einige gelbe Flecken oder wenigstens Hartstellen, die vorzugsweise von der Spitze ausgehen und zum Ansatz weiterwandern, auf Trockenschäden. Wiederaufsättigen der Nadeln läßt die toten Stellen im Sommer an gelber oder aber dunkler Verfärbung erkennen, vor allem heben sich dann die ungeschädigten Bereiche prall, steif und lebhaft grün ab. Anders im Winter. Die frischen Nadeln entbehren schon von Anfang der lebhaft dunkelgrünen Färbung; sie sind eher grünbraun. Der Glanz geht sehr bald verloren, die Farbänderung ist kein Kriterium mehr, auch das Einfallen der Seitenwände zeigt nicht mehr die Nähe der Schadensgrenze an, da sich selbst längere Zeit welke Nadeln vollständig lebend erwiesen. Einziehen und schraubiges Verdrehen sind selten zu beobachten, meist erst dann, wenn die Nadeln zum größten Teil abgestorben sind und brechen. Dem ersten Turgeszenzverlust, dem „Weichwelkstadium“, folgt ein „Zähwelkstadium“, bei dem die Nadeln noch biegsam bleiben, jedoch gegenüber früher schon etwas Widerstand zu spüren ist, und die Fältelung auf der durch das Biegen verkürzten Seite nicht mehr so eng wie früher, sondern mit größerem Abstand dafür aber tiefer einschneidet. Nach Aufquellen heben sich geschädigte Stellen nur sehr undeutlich ab. Die Diagnose ist an mikroskopische Untersuchung gebunden. Offensichtlich wird im Winter das Wasser bereits im Inneren der Nadeln fester zurückgehalten als im Sommer, so daß es nicht so rasch an die verdunstende Oberfläche gelangt.

Noch auffallender als die Zirbe zeigt *Rhododendron ferrugineum* verschiedenes Welke- und Schadensbild in Winter und Sommer. Die glänzenden dunkelgrünen, unterseits dunkelroten, vorjährigen Blätter verlieren im Sommer sehr rasch ihr Wasser, werden weich und die Ränder rollen sich nach unten ein. Auf den eingerollten, noch sehr weichen, bereits etwas heller grünen, aber noch lebenden Blättern stellen sich bald, inselartig verstreut, dunkle kastanienbraune Flecken ein, die sich geschwinde ausdehnen und schließlich über die Hälfte bis Dreiviertel des noch immer weichen Blattes erstrecken. Das Blatt ist also größtenteils abgestorben, solange es noch weich und biegsam ist; erst nachher wird es unvermittelt hart und spröde. Die Schäden sind ohne weiteres sehr gut sichtbar; um absolut sicherzugehen, wurden die Blätter dennoch in die feuchte Kammer zur Aufsättigung gebracht. Entsprechend der herabgesetzten Verdunstungsgeschwindigkeit behalten die Proben im Winter länger Turgor, Glanz und dunkle Farbe, die allerdings schon seit dem Herbst infolge des Anthocyangehaltes in der obersten Palisadenparenchymschicht ins Kupfrige spielt. Beim allmählichen Vertrocknen werden die Blätter zunächst weich und heller, verlieren den Glanz und bleiben entweder glatt oder biegen ihre Ränder nur eben merklich nach unten ein. Dem „weichwelken“ Stadium folgt ein lange anhaltendes „zähwelkes“, das durch ledrig-zähe Biegsamkeit der gelblich gewordenen Blätter gekennzeichnet ist. In diesem Zustand können die Blätter noch vollkommen intakt sein (höchstens einzelne Zellen abgestorben) oder aber nach Aufsättigung kleinere, auch im Winter dunkle,

verstreute Flecken den kritischen Wert anzeigen. Gleitend nimmt der Wassergehalt ab, die Zähigkeit der Blätter und die Zahl und Ausdehnung der Flecken zu, bis (ganz im Gegensatz zu der sommerlichen Plötzlichkeit) vorerst begrenzte Bereiche, endlich die ganze Blattbreite, bruchhart werden. Bei *Rhododendron ferrugineum* fällt dieses langsame winterliche Austrocknen nach Eintreten der ersten Defekte im Vergleich zum raschen Verpuffen des Wassers im Sommer sehr auf. Während im Sommer die Austrocknungsgrenze für das ganze Blatt ziemlich gleichzeitig erreicht ist, was sich im gleichzeitigen Absterben großer Flächen kundtut, vermag im winterlichen Blatt eine ansehnliche Zahl von Zellen wesentlich länger auszuhalten als die empfindlichen. Außerdem ist auch die Steifheit der Blätter vor Erreichen des kritischen Punktes im Winter ein Ausdruck der Wasserarmut. Die Gegenüberstellung der ermittelten Zahlenwerte bestätigt dies: Im Winter sinkt der kritische Wassergehalt auf weniger als zwei Drittel (63%), der Wasserschaden bei Drittelschaden sogar fast auf die Hälfte (54%) des sommerlichen Maximalwertes.

Von allen untersuchten alpinen Arten kommt *Rhododendron ferrugineum* die größte Amplitude im Jahresgang der Austrocknungsresistenz zu (Abb. 2). Mehr als dies verdient jedoch die ausgeprägte Anpassungsfähigkeit an das augenblickliche Temperaturklima und die Labilität der Resistenz bei *Rhododendron* hervorgehoben zu werden. Ganz im Gegensatz zur Zirbe, die aus ihrer sibirischen Heimat eine große Autonomie in der jahreszeitlichen Umstellung ihres Protoplasmas von Aktivität zur Winterruhe mitgebracht hat und nur zu gewissen Zeiten (zwischen September und November im Sinne einer Abhärtung, im Spätwinter im Sinne eines Resistenzverlustes, vgl. Pisek und Schiefl 1947) in bemerkenswertem Ausmaße durch die Witterung beeinflusst wird, folgt dieser die Alpenrose rasch und willig, kaum behindert durch die auch ihr unverkennbar innewohnende Rhythmik. Der Kaltlufteinbruch im August 1950 genügte, um bei der Alpenrose im Gegensatz zur Zirbe eine merkliche Resistenzzunahme hervorgerufen und damit den herbstlichen Anstieg einzuleiten. Schon im Oktober fast auf winterlichem Stand, erreichte die Widerstandsfähigkeit ihren Höhepunkt während des sehr kalten, äußerst schneearmen Dezember mit einem kritischen Wassergehalt bei 50% des Trockengewichtes. Auf die Jännerversuche 1951 folgt eine Lücke in den Bestimmungen wegen der Schneemassen, die alle Versuchspflanzen begruben.

Es ist wohl dem außergewöhnlich kalten Frühjahr zuzuschreiben, daß die Austrocknungsresistenz im Mai noch sehr ansehnlich war und erst im Juli zur Zeit der Blüten- und Blattentfaltung auf ihren kleinsten Wert zurückgekehrt ist. Während des warmen Nachsommers 1951 stieg die Widerstandsfähigkeit bis Ende September kaum an, ganz im Gegensatz zum Vorjahr, dessen Herbst viel kälter war. Schon Pisek und Schiefl (1947) haben erstmals auf Grund von Frosthärtebestimmungen diese ausgesprochene Labilität der endogenen Rhythmik von *Rhododendron* betont.

Ganz ähnlich wie die Alpenrose verhält sich in Austrocknungsresistenz, Frosthärte und deren Jahresgängen *Arctostaphylos Uva ursi*. Die

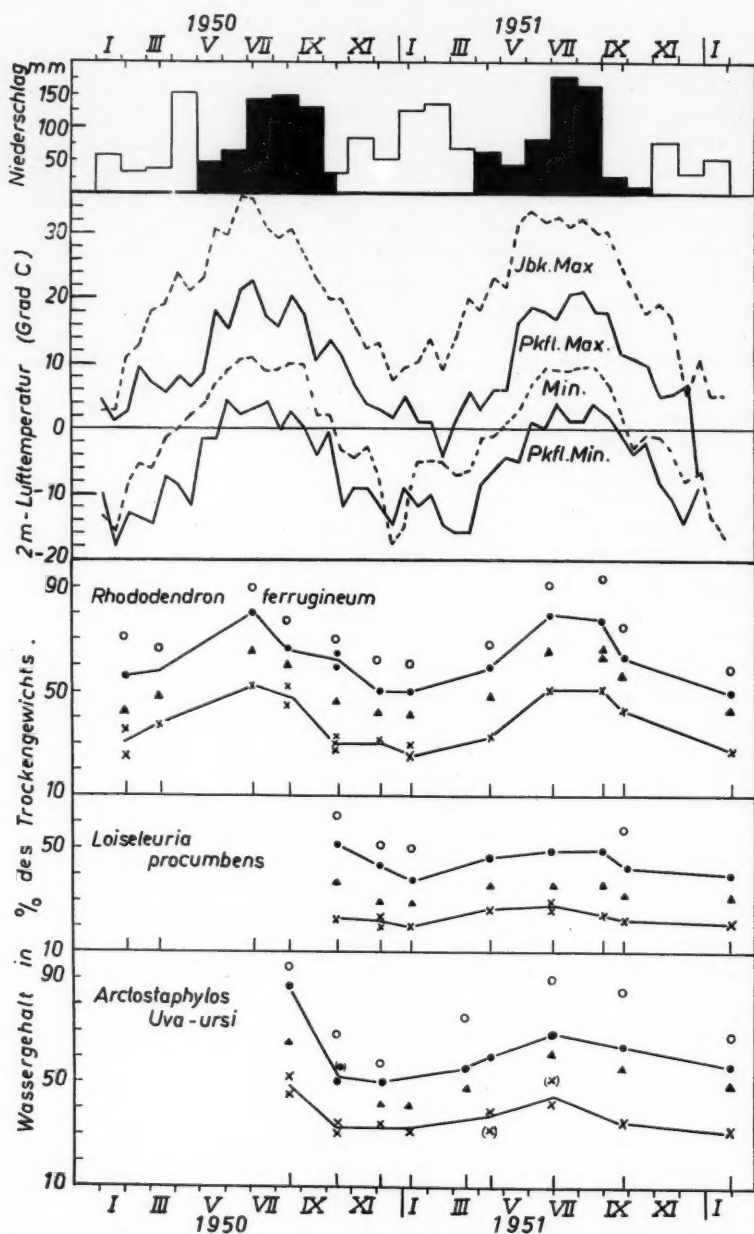


Abb. 2. Niederschläge in Millimeter je Monat (schwarz = als Regen, weiß = als Schnee) auf dem Patscherkofel (2000 m). Halbmonats-Temperatur-extreme auf dem

Jahresamplitude ihrer Trockenresistenz ist allerdings geringer. Wie *Rhododendron* registriert auch *Arctostaphylos* getreu die thermischen Klimabedingungen. Um den Einfluß des Alterns der Blätter besser verfolgen zu können, wurden von *Arctostaphylos* stets Blätter desselben Zuwachses (und zwar des von 1950) verwendet. Die Blätter, die im Mai—Juni sproßten, waren im August zwar auf ihre endgültige Größe herangewachsen, hatten sich aber nicht zur Dicke und Härte der reifen Blätter ausgestaltet. Die noch fühlbar zarten, heurigen Blättchen waren im August—September recht empfindlich. Ein Wassergehalt von 85—90% des Trockengewichtes wurde für sie kritisch; sank er weiter auf 65%, gab es 10% Schäden<sup>2</sup>. Mit einem sprungartigen Resistenzanstieg auf den vollen Winterwert schickten sich im Oktober die Blätter zu ihrer ersten Überwinterung an, aus der sie erst anfangs Mai wieder „erwachten“. Die einmal überwinterten Blätter behielten auch im Sommer eine gewisse Widerstandsfähigkeit gegen Austrocknung bei, die im Spätherbst, als es der zweiten Überwinterung entgegenging, wieder rasch anwuchs, aber nicht ganz auf das frühere Maximum stieg, was sich besonders im Auftreten erster Schäden zeigt. Und das, obwohl inzwischen die Trockensubstanz im Blatt mit dem Altern zugenommen hat und daher schon im Wege der Berechnung<sup>3</sup> die Wassergehaltszahlen gedrückt werden und dadurch eher höhere Resistenz vorgetäuscht werden könnte.

Der Jahresgang der Austrocknungsresistenz bei *Loiseleuria procumbens*, der frosthärtesten Ericacee (Ulmer, Pisek und Schießl!), zu dessen Ermittlung stets Blättchen vorjähriger Zuwächse herangezogen wurden, verläuft außerordentlich flach, d. h. mit geringer Schwankung zwischen Sommer und Winter. *Loiseleuria* verträgt schon im Sommer so starkes Austrocknen (kritischer Wassergehalt im Sommer bei 50% des Trockengewichtes, entspricht 50% Defizit vom Frischwassergehalt), daß im Winter bei Resistenzzunahme ein nicht sehr viel geringerer Wassergehalt erwartet werden kann (kritischer Wassergehalt im Winter 35% Trockengewicht = 65% Defizit). Das Resistenzminimum wurde sehr früh, nämlich schon anfangs Mai, zur Zeit des bevorstehenden Blühbeginns erreicht, ungeachtet der Kälte, die damals noch herrschte. Andererseits macht sich trotz Anhaltens der warmen Witterung bereits während des September bei 30%igen Schä-

<sup>2</sup> Pisek und Berger (1938) fanden an ähnlichem Blattmaterial im August einen subletalen Wassergehalt von 63—45% des Trockengewichtes.

<sup>3</sup> Wassergehalt =  $\frac{\text{Frischgewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Trockengewicht}} \times 100$ .

Patscherkofel (ausgezogene Kurve) und in Innsbruck (unterbrochene Kurve) während der beiden Jahre 1950 und 1951. Austrocknungsresistenzgänge von stets vorjährigen Blättern von *Rhododendron ferrugineum* und *Loiseleuria procumbens* sowie von Blättern des Zuwachses 1950 von *Arctostaphylos Uva-ursi*. Ordinate: Wassergehalt in Prozenten des Trockengewichtes, unmittelbar vor Auftreten erster Schäden (○), bei 1—2% Schäden (● kritischer Schaden), bei 10% Schäden (▲ subletaler Schaden) und bei 30% Schaden (× Drittelschaden).

den ein Resistenzanstieg geltend, der mit dem Anlangen auf der winterlichen Höhe der Widerstandsfähigkeit im Oktober endet. Man kann darin Anzeichen größerer Autonomie in der Jahresrhythmik als bei den vorher genannten Ericaceen sehen, zumal Pisek und Schiefl dasselbe für die Frosthärte hervorhoben.

Liegen von *Hedera Helix* auch keine Jahresgänge der Frosthärte vor, so lohnt es sich doch, sie als ozeanisches Element in die Untersuchungen einzubeziehen. Hoher Frischwassergehalt gestattet den Efeublättern einen großen Jahresausschlag ihrer Trockenresistenz. Das im Tal viel später als auf dem Patscherkofel einsetzende Frostwetter ermöglichte es, daß im Zusammenhang mit der späten Blüte (bis Mitte Oktober) die sommerliche

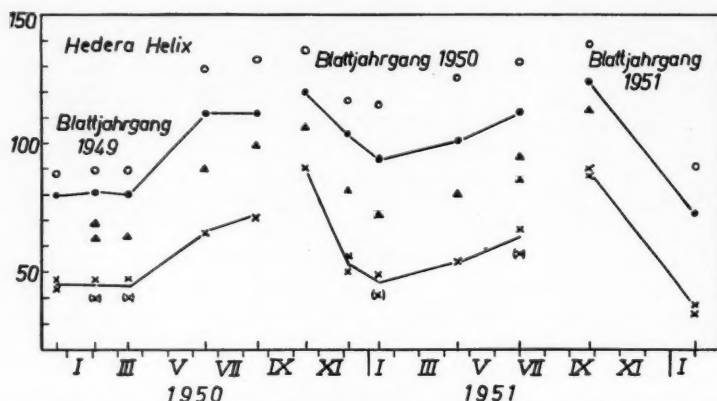


Abb. 3. Jahresgang der Austrocknungsresistenz vorjähriger Blätter von *Hedera Helix*. Erläuterung wie bei Abb. 2.

Aktivität und infolgedessen auch die hohe Empfindlichkeit weit in den Herbst hinein erhalten blieben (Abb. 3). In der kurzen Frist von 1–2 Monaten stellen sich die Blätter dann zur Winterruhe um, die mit maximaler Resistenz verbunden ist. Im allgemeinen folgt die Austrocknungsresistenz des Efeus dem Gang der Lufttemperaturen in 2 m Höhe, bleibt aber dann im Frühjahr etwas zurück. Wie bei *Arctostaphylos* beeinflusst das Altern der Blätter merklich den Resistenzwechsel, vor allem die Rückkehr zum Sommerwert.

#### Verwöhnungsversuche

Im Jänner 1951 und 1952 wurden Proben von *Pinus Cembra*, *Rhododendron ferrugineum* und *Hedera Helix* nicht nur im Freien aufgestellt, sondern auch im warmen Zimmer bei 18–20° C der Austrocknung überlassen, um den Einfluß eventueller Verwöhnung auf die Austrocknungsresistenz zu erkunden. Bis zum Eintreten erster Schäden verging mindestens eine Woche. Da wir uns bewußt waren, daß die zu erwartenden Schwankungen sich unterhalb des Ausmaßes des Jahresausschlages halten, also recht mäßig sein



würden, hatten wir uns auf diese drei Arten mit der größten Jahresschwankung der Austrocknungsresistenz beschränkt.

Sämtliche Versuchsobjekte senkten ihre Austrocknungsresistenz beziehungsweise zwar nicht bis aufs Sommerminimum (endogene Rhythmik!), wohl aber auf das herbstliche Ausmaß. Bei der Zirbe ging der kritische Wert um 48% seiner Jahresgesamtschwankung zurück (vom Jahresmaximum bei 70—76% Wassergehalt auf 81—93% Wassergehalt; Jahresminimum bei 100% Wassergehalt pro Trockengewicht); der Wert bei Drittschaden sank um rund 40% der Jahresschwankung (vom Maximum bei 53—54% Wassergehalt auf 61—67%; Minimum bei 75% Wassergehalt) zurück. Bei *Rhododendron* war die Einbuße 50% bzw. 52%, bei *Hedera* etwa 45% bzw. 40% der Jahresschwankung.

Obwohl es uns sehr verlocken würde, in obigen Ergebnissen spezifische Unterschiede in der Verwöhnbarkeit zu erblicken, wagen wir es doch nicht, diesen Stichproben solche Bedeutung zuzumessen. Vielmehr genügt uns schon die Tatsache, daß die winterliche Austrocknungsresistenz durch Wärme ebenso wie die Frosthärte und dieser gleichsinnig beeinflusst wird, als bemerkenswertes Indizium für die Verknüpfung der beiden Eigenschaften.

### Kurze Besprechung und Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Isolierte Nadeln von *Pinus Cembra*, *Picea excelsa* und Blätter von *Rhododendron ferrugineum*, *Arctostaphylos Uva-ursi*, *Loiseleuria procumbens* sowie von *Hedera Helix* wurden im Laufe von zwei Jahren zu allen Zeiten bei der für die betreffende Jahreszeit charakteristischen Temperatur der Austrocknung überlassen. An Hand definierter Schäden wurde jeweils der Grad der plasmatischen Austrocknungsresistenz, d. i. die Widerstandsfähigkeit des Plasmas gegen Schäden infolge hohen Wasserverlustes bestimmt. Er wird angegeben als jener Wassergehalt (bezogen auf das Blatztrockengewicht), den die Blätter noch aufweisen, wenn sie zu etwa 1—2% (kritischer Wassergehalt), um 10% (subletaler Wassergehalt) und zu einem Drittel geschädigt sind.

2. Die Austrocknungsresistenz weist eindeutig eine Jahresrhythmik auf: Bei allen untersuchten Arten nimmt die Resistenz im Herbst zu und verweilt während der Wintermonate auf ihrem Höhepunkt, von dem sie im Frühling allmählich wieder absinkt. Der Abstand der beiden Extremwerte ist von Art zu Art stark verschieden (Tabelle).

Setzt man den Wassergehalt (in % Trockengewicht), bis zu welchem die Blätter im Sommer austrocknen müssen, damit sie erste Schäden zeigen (kritischer Wassergehalt), = 100, so treten solche im Winter erst auf, wenn der Wassergehalt gesunken ist auf:

80% . . .	<i>Loiseleuria procumbens</i>
80% . . .	<i>Picea excelsa</i>
73% . . .	<i>Pinus Cembra</i>
71,5% . .	<i>Arctostaphylos Uva-ursi</i>
67% . . .	<i>Hedera Helix</i>
63% . . .	<i>Rhododendron ferrugineum</i>



$\frac{1}{3}$ -Schäden werden im Winter bei 71–50% des entsprechenden Sommergehalts bemerkt:

71%	. . .	<i>Loiseleuria procumbens</i>
67%	. . .	<i>Arctostaphylos Uva-ursi</i> , <i>Pinus Cembra</i>
64%	. . .	<i>Picea excelsa</i>
54%	. . .	<i>Rhododendron ferrugineum</i>
50%	. . .	<i>Hedera Helix</i>

Am geringsten ist der Jahresausschlag bei *Loiseleuria*, etwas stärker schwankt die Resistenz bei den Nadelhölzern, besonders bei der Fichte (wenn Drittelschaden die Grundlage der Berechnung bildet). Den Koni-

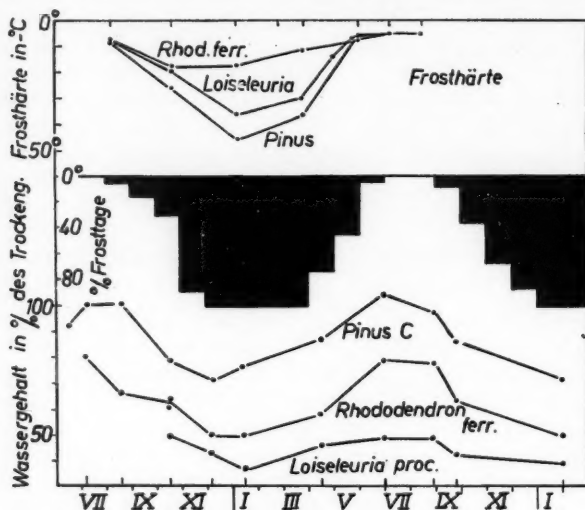


Abb. 4. Frosthärtigkeit in Minusgraden Celsius (nach Pisek und Schiefl 1947) und Austrocknungsresistenz (als kritische Wassergehalte) von *Pinus Cembra*, *Rhododendron ferrugineum* und *Loiseleuria procumbens*. Frosthäufigkeit auf dem Patscherkofel (Frosttage in % Monatstage) während der Winter 1950/51 und 1951/52. Die Jahresgänge der Frosthärtigkeit und Austrocknungsresistenz verlaufen im wesentlichen konform mit den Temperaturverhältnissen (hier als Frosthäufigkeit dargestellt).

feren schließt sich *Arctostaphylos Uva-ursi* mit einer ähnlichen Breite der Jahresschwankung an. Alle diese Arten werden von *Rhododendron ferrugineum* und *Hedera* übertroffen.

Der jahreszeitliche Rhythmus der Austrocknungsresistenz stimmt allgemein und grundsätzlich mit dem der Frosthärtigkeit nach Ulmer (1937), Pisek und Schiefl (1947) überein (Abb. 4). Beide Eigenschaften sind zum Teil endogen, zum Teil durch das augenblickliche Klima bedingt. Bei manchen Arten sind sie vorwiegend endogen („resistenzstabile Arten“), bei anderen stark temperaturabhängig („resistenzlabile Arten“). Bei

*Rhododendron ferrugineum*, das hinsichtlich der Frosthärte nach Pisek und Schiefl (S. 48) ausgesprochen labil erscheint, finden sich unverkennbare Anzeichen, daß dasselbe auch hinsichtlich seiner Austrocknungsresistenz gilt.

3. Wenn auch spezifische Wasserkapazität, Form, Größe und Lage der Zellen im hoch differenzierten Spermatophytenblatt die Höhe der Austrocknungsresistenz beeinflussen (Iljin 1930), so kann die Jahresschwankung, die sich aus der Untersuchung gleichwertigen Materials derselben Individuen ergibt doch als rein plasmatisch im Sinne Höflers (1943) angesehen werden. Während eines Jahres ändert sich die Ausgestaltung, die Form und Größe der Zellen vorjähriger, reifer Blätter nicht so, daß ein maßgeblicher Einfluß dieser Gestaltsfaktoren auf die Resistenzschwankungen durch diese Änderungen zu befürchten wäre.

4. Die gleichzeitige und gleichsinnige Beeinflussung von Austrocknungsresistenz und Frosthärte durch den inneren Zustand (Wechsel zwischen Aktivitäts- und Ruhezeiten) wie auch durch thermische Einwirkung, möge diese nun natürlich (Witterung am Standort) oder aber künstlich (Enthärtungsversuche) die Pflanzen treffen, weist eindeutig darauf hin, daß beiden Arten pflanzlicher Resistenz eine gemeinsame plasmatische Komponente zugrunde liegt.

Man kann jedoch deshalb nicht erwarten, daß bei bestimmter Änderung der plasmatischen Grundlage die Frosthärte, die Austrocknungsresistenz oder gar die reichlich komplexe Dürre-resistenz sich alle stets gleichzeitig in ähnlichem Ausmaße ändern müßten. Jede dieser Resistenzen umfaßt außer der gemeinsamen Teileigenschaft der plasmatischen Resistenz noch andere Eigenschaften oder hängt von verschiedenen Umständen ab. So ist z. B. für die Dürre-resistenz alles, was die Wasseraufnahme erleichtert und die Wasserabgabe herabsetzt, in erster Linie maßgebend, während dies für die Frosthärte überhaupt keine Rolle spielt.

#### Literatur

- Arvidsson, I., 1951: Austrocknungs- und Dürre-resistenzverhältnisse einiger Repräsentanten ödländischer Pflanzenvereine nebst Bemerkungen über Wasserabsorption durch oberirdische Organe. Oikos, Suppl. 1, Kopenhagen 1951.
- Höfler, K., 1943: Über die Austrocknungsfähigkeit des Protoplasmas. Ber. dtsh. Bot. Ges. 60.
- 1950: Durch plasmatische Trockengrenzen bedingte Lebermoosvereine. Abstract of Comm., Int. Bot. Congr., Stockholm.
- H. Migsch und W. Rottenburg, 1941: Über die Austrocknungsresistenz landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Forschungsdienst 12.
- Iljin, W. S., 1927: Über die Austrocknungsfähigkeit des lebenden Protoplasmas der vegetativen Pflanzenzelle. Jb. wiss. Bot. 66.
- 1930: Über die Ursache der Resistenz von Pflanzenzellen gegen Austrocknung. Protoplasma 10.
- 1933: Über das Absterben der Pflanzengewebe durch Austrocknung und über ihre Bewahrung vor dem Trockentode. Protoplasma 19.
- 1934: The point of death of plants at low temperature. Bull. Assoc. Russe p. Rech. sc. a Prague I.
- 1935: Lebensfähigkeit der Pflanzenzellen in trockenem Zustand. Planta 24.

- Irmischer, E., 1912: Über die Resistenz der Laubmoose gegen Austrocknung und Kälte. Jb. wiss. Bot. 50.
- Keßler, W., und W. Ruhland, 1958: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta 28.
- Larcher, W., 1953: Schnellmethode zur Unterscheidung lebender von toten Zellen mit Hilfe der Eigenfluoreszenz pflanzlicher Zellsäfte. Mikroskopie 8.
- Levitt, J., 1951: Frost, drought and heat resistance. Ann. Rev. of Pl. Phys. II.
- Meusel, H., 1945: Vergleichende Arealkunde. Berlin.
- Molisch, H., 1897: Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen. Jena.
- Oppenheimer, H. R., 1932: Zur Kenntnis der hochsommerlichen Wasserbilanz mediterraner Gehölze. Ber. dtsh. Bot. Ges. 50 A.
- Pisek, A., 1950: Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsafts bei *Rhododendron ferrugineum*, *Pinus Cembra* und *Picea excelsa*. Protoplasma 39.
- und E. Berger, 1938: Kutikuläre Transpiration und Trockenresistenz isolierter Blätter und Sprosse. Planta 28.
- und R. Schießl, 1947: Die Temperaturbeeinflussbarkeit der Frosthärte von Nadelhölzern und Zwergsträuchern an der alpinen Waldgrenze. Ber. Naturw.-med. Verein Innsbruck 47.
- Rouschal, E., 1938: Zur Ökologie der Macchien I. Jb. wiss. Bot. 87.
- Seible, D., 1939: Ein Beitrag zur Frage der Kälteschäden an Pflanzen bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt. Beitr. zur Biol. d. Pfl. 26.
- Spranger, E., 1941: Das Erfrieren der Pflanzen über null Grad mit besonderer Berücksichtigung der Warmhauspflanzen. Gartenbauwiss. 16.
- Ullrich, H., 1945: Biologische Kältewirkungen und plasmatische Frostresistenz. Protoplasma 38/1.
- Ulmer, W., 1937: Über den Jahresgang der Frosthärte einiger immergrüner Arten der alpinen Stufe sowie der Zirbe und Fichte. Jb. wiss. Bot. 84.

# Vorläufige Versuche über die Elastizität des Atraktoplasmas

Von

**Hans H. Pfeiffer**

Aus dem Laboratorium für Polarisations-Mikroskopie, Bremen

Mit 1 Textabbildung

(Eingelangt am 2. Dezember 1953)

1. Die Literatur über elastische Formänderungen von Zellen als Ganzes wird von Heilbrunn (1928, S. 88) mitgeteilt. Daß auch das Innere des Protoplasmas sich gegen Deformationen elastisch verhält, wird zwar manchmal als weniger gesichert angesehen (Heilbrunn 1953, S. 85), kann aber nach meiner Ansicht nicht bestritten werden (vgl. Seifriz 1924; 1936, S. 229; 1953, S. 39; Pfeiffer 1936; 1937). Wegen der Bedeutung des Merkmals für die leptonische Struktur des Protoplasmas und seiner morphologisch faßbaren Anteile dürfte es angebracht sein, über neuere Versuche zur Ermittlung eines Youngschen „Elastizitätsmoduls“ des nach einem jüngst mitgeteilten Verfahren Dans isolierten Atraktoplasmas kurz zu berichten. Nachdem in Anwendung einer von Mirsky und Ris beschriebenen Methode als Chromosomen zu deutende fadenförmige Gebilde der Zellkerne isoliert und auf ihr polarisationsoptisches Verhalten studiert werden konnten (Pfeiffer 1950), wollte die Isolierung anderer Kerngebilde mitotisch tätiger Zellen aus Kulturen *in vitro* nicht glücken (Pfeiffer 1951), bis nicht allein von Mazia und Dan (1952) die Methode der Isolierung des nach Fujii (1951) als Atraktoplasma zu bezeichnenden Kernanteils veröffentlicht, sondern mir auch das von ihnen dabei benutzte Duponol D und C durch Prof. Dan in mehreren Proben überlassen worden war. Mit diesen Proben und einigen eigenen Präparaten isoliertes Atraktoplasma ist alsbald dessen cytochemisches und polarisationsoptisches (Pfeiffer 1953) ebenso wie dessen elastisches Verhalten geprüft und (nach Lösen) seine Strömungsdoppelbrechung vermessen worden; über die Versuche zum Nachweise der Elastizität sei hier in Kürze berichtet.

2. Kernteilungsabläufe lassen sich kaum irgendwo besser als an Gewebekulturen *in vitro* verfolgen, besonders wenn nicht die schlecht erkennbaren und durchgängig kleinere Chromosomen und Spindelapparate zeigenden Gewebe von Vertebraten, sondern beispielsweise solche von In-

sekten (Heuschrecken) explantiert werden. Zur Isolierung eignen sich besonders gut an Metaphasen reiche Explantate.

Unerläßlich für die Isolierung der atraktoplasmatischen Spindeln ist das Fixieren in 30% Äthylalkohol bei  $-10^{\circ}\text{C}$  einige Wochen lang, um damit Auflösen oder Koagulieren des Atraktoplasmas zu vermeiden. Nach meinen Erfahrungen günstiger als eine mechanische Isolierung in großer Luer-Spritze mit Spritznadel 25 ist die chemische Isolierung. Dazu kommen die nach angereicherter Metaphasenrate ausgewählten Explantate nach Dan 30 Min. bei Zimmertemperatur in ein gleiches Volumen  $\text{H}_2\text{O}_2$ , und dieses Volumen wird durch Hinzufügen von 1–2% Duponol verdoppelt. In 3–5 Stunden wird unter gelegentlichem Schütteln das gesamte Cytoplasma dispergiert, und das Atraktoplasma der Kernspindeln bleibt erhalten. Durch mehrmaliges mäßig beschleunigtes Zentrifugieren und Resuspendieren in alkalisiertem Wasser (pH 8,5) bei niedriger Temperatur werden die atraktoplasmatischen Spindeln angereichert.

Um auf möglichst einfache Weise die schwierige Bestimmung des statischen Elastizitätsmoduls  $E$  vorzunehmen, ist das Verfahren der Dehnung der Objekte in Liquid. paraffinum als Medium durch Belasten (Justi 1944, S. 75) gewählt worden. Mehrmals gemessen werden in zueinander gehörenden Serien bei verschiedenen dehnenden Kräften  $P_0, P_1, P_2 \dots$  die initiale Länge  $L$  und Breite  $B$  (als Durchmesser des Querschnitts gedacht) der isolierten Kernspindeln und ihre Längenzunahme  $\Delta L$  durch die jeweilige Belastung, dann ist der (statische) Elastizitätsmodul der Dehnung  $E$

$$E = \frac{L}{\Delta L} \cdot \frac{P}{B}. \quad (1)$$

Die Fortführung des Versuches mit mehreren Belastungsgrößen erlaubt dem Beobachter, sich aus der Konstanz der erhaltenen  $E$ -Werte zu überzeugen, daß die Dehnungen noch im Bereiche der Hookeschen Proportionalitätszone gelegen sind. Bei Messungen im CGS-System resultieren die Moduln als dynes  $\times \text{cm}^{-2}$ .

Oft zeigen die atraktoplasmatischen Spindeln bei den Längsdehnungen zugleich eine faßbare Kontraktion ihrer Breitendimension. Wegen der geringen Größe dieser zu messenden Änderungen ist die dabei nicht zu vermeidende Fehlmessung besonders schwerwiegend (Justi 1944, S. 84), so daß die Poissonsche Zahl  $\mu$ , welche erfahrungsgemäß zwischen 0,2 und 0,5 liegen muß, nur in wenigen Fällen aus

$$\mu = \frac{\Delta B / \Delta L}{B / L} \quad \text{oder} \quad \mu = \frac{L \cdot \Delta B}{B \cdot \Delta L} \quad (2)$$

bestimmt werden konnte.

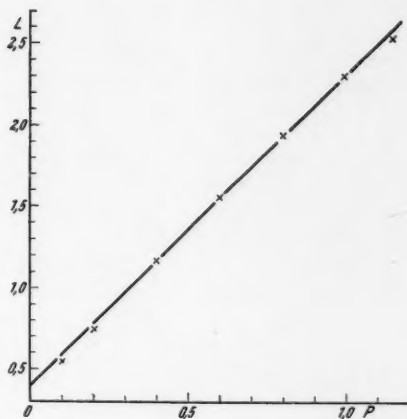
3. Bei Durchführung einer Messungsserie an einer zuvor nach Länge und Breite vermessenen isolierten Kernspindel stellt man durch langsam gesteigertes Belasten mit ringförmigen Metallscheibchen die Län-

genänderungen fest und findet in graphischer Darstellung im Koordinatensystem (Abb.), daß die meisten Meßpunkte mit Ausnahme der letzten und oft auch der zwei oder drei ersten auf einer Geraden liegen. Die genannten Abweichungen sind sogleich erklärlich. Bei zu hoher Belastung muß nämlich bereits der Hookesche Elastizitätsbereich überschritten werden und liegen die Meßpunkte unterhalb der Geraden, und bei den ersten Versuchen der Serie wird die Dehnung nicht selten zu groß, weil die experimentelle Isolierung der Objekte einen auch polarisationsoptisch nachgewiesenen Grad von Desorientierung hervorgerufen hat, welche durch das anfängliche Belasten erst kompensiert werden muß. Da bei dem beträchtlichen Ausmaß der Fehlermöglichkeiten unserer Bestimmung keine besonders große Genauigkeit angestrebt werden kann, läßt sich der Modul  $E$  nach Art einer graphisch gelösten Gleichung ersten Grades mit einer Unbekannten schon aus der Kurve berechnen. Die fehlerfreien (mittleren) Dehnungsverlängerungen gehorchen nach Gl. (1) der Gleichung:

$$\Delta L = \frac{L \cdot P}{B \cdot E} = CP, \text{ wenn } C = \frac{L}{BE}. \quad (3)$$

Daher gehorcht die Kurve der Abbildung einer Gleichung, wie:  $y = A + \Delta L = A + CP$ . Wir können also  $C$  (und die hier nicht interessierende Größe  $A$ ) aus zwei Wertpaaren  $P, y$  berechnen, welche wir am Anfang und am Ende der Geraden ablesen, und erhalten aus den beiden daraus folgenden Gleichungen  $C$  und damit nach Gl. (3) einen Wert für  $E = 1,57 \times 10^6 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-2}$ . Andere Messungen haben für das atraktoplasmatische Gel schwankende Werte zwischen  $0,8$  und  $1,6 \times 10^6 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-2}$  ergeben. Noch genauer könnte der Größenwert  $E$  ausfallen, wenn wir (rechnerisch) alle tabulierten Werte des mittleren Meßbereiches und die Differenzen  $P_5 - P_4, P_4 - P_3 \dots$  und  $y_5 - y_4, y_4 - y_3 \dots$  ermitteln und aus mehreren Werten für  $C$  das arithmetische Mittel und nach dessen Substitution in Gl. (3) das Ergebnis für  $E$  bestimmen würden. Diese Erschwerung erübrigt sich aber ebenso wie eine Fehlerrechnung der Bestimmung, weil bei dem Grade der Meßschwierigkeiten doch kaum mehr als die Größenordnung des Moduls ausreichend genau ermittelt werden kann.

4. Die Literatur (Tischler 1942/43, S. 133, 447) berichtet von Kernspindeln, welche aus Schnitten frei wurden und unter Formerhaltung in den Präparaten





als ganzes flottierten, sich aber bei mechanischem Druck nicht deformierten (Lavdowsky 1894, Gates 1912, Showalter 1923, Němec 1929). Es kann als sicher angenommen werden, daß in diesen Fällen wie in eigenen früheren Versuchen (Pfeiffer 1951) die Bemühungen, die Objekte auf Elastizität zu prüfen, vorzeitig aufgegeben, wenn überhaupt unternommen worden sind. Ebenso wenig kann aus Beobachtungen von Kamiya (1937) über das Verhalten der Kernspindeln in der Elektrophorese etwas gegen die hier behandelten Meßversuche gefolgert werden. Das vorstehende Ergebnis am isolierten Atraktoplasma steht also noch allein, auch wenn für das Cytoplasma *in vitro* kultivierter Zellen Elastizität und ein statischer Dehnungsmodul ungefähr derselben Größenordnung in sehr subtilen Meßversuchen sichergestellt worden ist (Crick und Hughes 1950). Da nach der gleichen Methode für Seifenlösungen ein auch sonst in der Literatur verzeichneter Wert mit  $E \sim 0,3 \times 10^2 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-2}$  (Crick und Hughes 1950, S. 69) erhalten wurde, darf den Meßresultaten für den statischen Modul des Cytoplasmas  $E = 0,5$  bis  $0,6 \times 10^6 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-2}$  (Crick und Hughes 1950, S. 61) und damit auch den entsprechenden eigenen Befunden am isolierten Atraktoplasma  $E = 0,8$  bis  $1,6 \times 10^6 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-2}$  wohl Vertrauen entgegengebracht werden.

Nach obigen Vorschriften sind auch einige Versuche zur Ermittlung der Poissonschen Zahl  $\mu$  angestellt worden. Die Werte halten sich mit  $\mu \sim 0,42$  noch innerhalb des zu erwartenden Bereiches  $0,2 < \mu < 0,5$ .

Aber beides, der ermittelte statische Elastizitätsmodul  $E$  ebenso wie der gefundene Wert der Poissonschen Zahl  $\mu$  dürfen sicherlich als Beweis für das Elastizitätsverhalten des Atraktoplasmas gewertet werden, und mehr sollte die Bestimmung der Größenordnung beider Werte vorläufig auch nicht leisten.

### Summary

#### Preliminary Experiments on the Elasticity of Atractoplasm

Spindles of nuclei mostly from metaphases of explants *in vitro*, set free according to Dan's method by means of solutions of Duponol (a sodium lauryl sulfonate), have been studied according to their elasticity. The isolated atractoplasm has shown a static modul of elasticity  $E \approx 0.8$  to  $1.6 \times 10^6 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-2}$ , and, sometimes, a Poisson number of  $\mu \approx 0.42$ , that is to say the atractoplasmic gel of the spindles of nuclei is certain elastically. The values of the modul of elongation agree satisfactory with those values recently ascertained by Crick and Hughes with cytoplasm of explanted cells.

**Acknowledgements.** The author is mostly indebted to Prof. Katsuma Dan, Tokyo, for his kindly sent samples of Duponol D and C, to Prof. William Seifriz, Philadelphia (U.S.), for his manifested interest and encouragement, and to some members of the recent symposium at Cologne for their helpful discussion of the method of catching hold of isolated atractoplasm.

### Literatur

- Crick, F. H. C., and A. F. W. Hughes, 1950: Expt. Cell. Res. 1, 37.  
 Fujii, K., 1931: Cytology in the past and present. Iwanamo-Kozi (Tokyo 1931); japan., cit. nach Tischler.  
 Gates, R. R., 1912: Ann. of Bot. 26, 993.  
 Heilbrunn, L. V., 1928: The colloid chemistry of protoplasm. Berlin, Gebr. Borntraeger.



- Heilbrunn, L. V., 1953: An outline of general physiology, 3rd ed. Philadelphia and London, W. B. Saunders & Co.
- Justi, E., 1944: in F. Kohlrausch, Praktische Physik, 19. Aufl., 1, 74. Leipzig, B. G. Teubner.
- Kamiya, N., 1937: Fujii Jubil. Vol., 1036. Tokyo.
- Lavdowsky, M., 1894: Anat. Hefte 4, 353.
- Mazia, D., and K. Dan, 1952: Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 826.
- Němec, B., 1929: Proc. Intern. Congr. Plant Sci. 1, 243.
- Pfeiffer, H. H., 1936: Nature (London) 138, 1054.
- 1937: Fujii Jubil. Vol., 701. Tokyo.
- 1950: Experientia 6, 334.
- 1951: Pubbl. Staz. Zool. Napoli 23, Suppl., 147.
- 1953: Unveröff. Mitt. bei Cytochem. Symposion am Max-Planck-Institut f. Hirnforsch. Köln (Okt. 1953).
- Seifriz, W., 1924: Brit. J. exper. Biol. 2, 1.
- 1936: Protoplasm. New York and London, McGraw-Hill.
- 1952: in A. Frey-Wyssling, Deformation and flow in biological systems, 1. Amsterdam, N. Holl. Publ. Co.
- Showalter, A. M., 1925: Bull. Torr. Bot. Cl. 52, 157.
- Tischler, G., 1942—1951: Allgemeine Pflanzenkaryologie, 2. Aufl., 2. Berlin, vorm. Gebr. Borntraeger.

# **Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften**

Von

**Helmut Kinzel**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 5 Textabbildungen

*(Eingelangt am 22. Jänner 1954)*

## **Einleitung**

Die Verwendung von Farbstoffen in der biologischen Forschung ist heute eine Selbstverständlichkeit geworden. Weniger selbstverständlich ist noch die Interpretation der bei den Färbungsversuchen erhaltenen Ergebnisse. Zur Zeit der Hochblüte der Mikrotechnik begnügte man sich oft mit einer rein empirischen Feststellung von Färbeergebnissen. Sehr bald aber wurde klar, daß der wissenschaftliche Wert der Färbungsreaktionen an toten wie an lebenden Objekten davon abhängt, ob sie sich kausal interpretieren lassen. Schon der erste botanische Vitalfärber, Pfeffer (1886), war stets auch von kausalen Fragestellungen geleitet, und etwa seit den Arbeiten Overtons beschäftigte man sich eingehend mit den physikochemischen Eigenschaften der Farbstoffe, ungefähr von der gleichen Zeit an auch mit denjenigen der Objekte. Die seither erschienene Vitalfärbeliteratur ist nahezu unübersehbar. Eine gute Übersicht über die ältere Periode findet sich bei Höber (1926). Aus der jüngeren Zeit wäre das Sammelreferat von Becker (1936) zu erwähnen, das sich allerdings nur auf Kern und Cytoplasma bezieht. Eine recht ausführliche Bibliographie findet sich auch in der Einleitung der Arbeit von Drawert (1938). Aus der Zeit nach 1920 sind in theoretischer Hinsicht vor allem die Arbeiten von Irwin, Scarth, Czaja und Strugger bedeutsam. Seit 1937 war es besonders Drawert, der die Abhängigkeit der Permeation und Speicherung der Farbstoffe von deren Dissoziationszustand untersuchte. Er belegte durch Modellversuche auf breiter Basis den schon von früheren Autoren (z. B. Irwin 1926) geäußerten Gedanken, daß es bei den basischen Farbstoffen vor allem die undissoziierte Farbbase sei, die durch das lebende Plasma fast widerstandslos permeieren kann, während dasselbe Plasma für die Ionen der Farbstoffe undurchlässig ist.

Dies sind sehr wichtige qualitative Aussagen, mit deren Hilfe sich eine ganze Anzahl von Färbungserscheinungen erklären läßt. Will man freilich

die kausale Interpretation eines Versuchsergebnisses bis zur letzten Konsequenz führen, so sind dazu quantitative Angaben nötig. Derartige Angaben, wie sie für die Physik kennzeichnend sind, sind schon im Bereiche der Chemie manchmal recht schwierig und vollends in der Biologie nur in wenigen Ausnahmefällen zu erreichen. Die Aufspaltung der Lebenserscheinungen in ihre physikochemischen Teilvorgänge — ein heute sehr modernes Teilgebiet der biologischen Forschung, das man analytische Biologie nennen könnte — hat ja von Anfang an in außerordentlich große theoretische und methodische Schwierigkeiten geführt, die sich mit jedem Schritt vorwärts noch vervielfachen. Die Ableitung von quantitativen Gesetzmäßigkeiten wird daher nur in gewissen besonders einfachen Fällen möglich sein.

Ein solcher einfacher Fall liegt den vorliegenden Ausführungen zugrunde: Basische Farbstoffe werden, vor allem aus alkalischen Lösungen, in denen sie weitgehend undissoziiert sind, von nahezu allen pflanzlichen Vakuolen aufgenommen und auch gespeichert. Ist der Zellsaft sauer, dann besteht die Möglichkeit, daß die Speicherung nach folgendem Mechanismus vor sich geht: Die durch das Plasma hindurch in die Vakuole eindringende Farbbase wird durch den sauren Zellsaft zur Dissoziation veranlaßt. Die entstehenden Ionen können nicht mehr durch das Plasma hindurch ins Freie, die in der Außenlösung reichlich vorhandenen Farbbasenmoleküle jedoch folgen dem auf diese Weise aufrechterhaltenen Diffusionsgefälle so lange, bis ein gewisser Gleichgewichtszustand erreicht ist. Obwohl die physikochemischen Voraussetzungen zum Verständnis dieses Vorganges schon seit langer Zeit bekannt waren, ist dieser doch wohl unter allen bekannten Mechanismen der Vitalfärbung der zuletzt entdeckte. Zwar fand Irwin schon in einer ihrer ersten Arbeiten (1923), daß Speicherung von Brillantcresylblau bei *Nitella* nur dann eintritt, wenn der Außen-pH größer ist als der Innen-pH, und kurz darauf wiesen McCutcheon und Lucké (1924) in eleganten Versuchen unter variierten Bedingungen nach, daß tatsächlich das Verhältnis zwischen Außen- und Innen-pH für den Ausfall der Färberversuche maßgebend sei, doch scheinen diese Ergebnisse nicht einmal von den Autoren selbst in ihrer vollen Bedeutung erkannt worden zu sein. Erst Brooks (1941) spricht ganz klar vom „trap mechanism“ bei der Speicherung schwacher Elektrolyte (l. c. S. 149). Auch Collander, Lönegren und Arhimo (1945) erkannten die Bedeutung dieses Mechanismus für die Farbstoffspeicherung. In jüngster Zeit beschäftigte sich Höfler (1947 a, 1949) eingehend mit dem Speicherproblem und prägte, unabhängig von Brooks, für diese Art von Speicherung den sehr anschaulichen Ausdruck „Ionenfalle“. Er lehrte auch, mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops die Ionenspeicherung von anderen Arten der Speicherung zu unterscheiden: Vakuolen, die nur Ionenspeicherung geben, sog. „leere“ Zellsäfte, zeigen nach Färbung mit Acridinorange rote Fluoreszenz, die nur in neutralen oder schwach alkalischen Farbbädern ( $\text{pH} > 6,5$ , Höfler 1947 b, S. 605) zustande kommt. Die sogenannten „vollen Zellsäfte“ dagegen enthalten wohl Stoffe, die mit dem Farbstoff eine chemische Bindung eingehen können, und zeigen nach Acridinorange-färbung Grünfluoreszenz, die auch in ziemlich sauren Farbbädern (bis pH 2, Pecksieder 1950) zustande kommt.

Außerdem läßt sich der pH-Wert leerer Zellsäfte durch Zusatz verdünnter Ammoniaklösung nach der alkalischen Seite verschieben, da Ammoniak in den Zellsaft permeieren kann. Die Ionenfallenwirkung der Zellsäfte wird dabei aufgehoben und der Farbstoff, wieder zu undissoziierter Farbbase verwandelt, exosmiert. Aus vollen Zellsäften dagegen läßt sich der gespeicherte Farbstoff nicht mit Ammoniak freisetzen (vgl. auch Höfler 1947 b, 1949).

Die Ionenspeicherung basischer Farbstoffe in leeren Zellsäften ist nun ein Vorgang, der sich verhältnismäßig leicht überblicken läßt und der daher der rechnerischen Behandlung zugänglich erscheint. Ansätze dazu finden sich schon in der zitierten Arbeit von Collander und Mitarb. In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die für diesen Vorgang geltenden Speichergesetze präzise zu formulieren.

Es muß erwähnt werden, daß die Ionenspeicherung ein Prozeß ist, der sehr wahrscheinlich auch an einem toten Modell (zwei wässrige Medien verschiedener pH, durch eine Lipoidmembran getrennt) vor sich gehen würde und der mit der eigentlichen Lebenstätigkeit der Zelle wohl nichts zu tun hat. Das Plasma ist infolge seiner lipoiden Eigenschaften nicht in der Lage, der hervorragend lipoidlöslichen Farbbase eine Schranke entgegenzusetzen, und der Farbstoff verteilt sich den physikochemischen Verhältnissen entsprechend. Trotzdem dürfte es lohnend sein, sich mit den physikochemischen Grundlagen solcher einfachen Vorgänge eingehend zu beschäftigen, weil ja das Verständnis des Einfachen die selbstverständliche Voraussetzung zum Verständnis des Komplizierten ist.

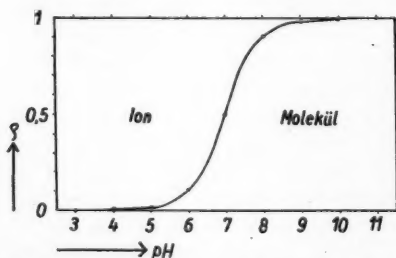
### I. Die pH-Abhängigkeit der Dissoziation einer schwachen Base

Die in der Biologie verwendeten basischen Farbstoffe sind in der Regel Chloride von zumeist recht schwachen Basen. Bringt man eine Lösung eines solchen Farbsalzes durch Zusatz von Pufferlösung auf einen bestimmten pH-Wert, dann läßt sich leicht errechnen, wieviel von dem Farbstoff als Kation und wieviel als undissoziierte Farbbase vorliegt. Die Grundformel, die den Ausgangspunkt der Berechnungen bildet, wurde aus dem Buche von L. Michaelis (1922, 1927) entnommen.

Der Dissoziationsrest  $\varrho$ , d. h. der Anteil an undissoziierten Farbbasenmolekülen, wird wiedergegeben durch die Formel:

$$\varrho = \frac{1}{1 + K_B \cdot \frac{[H]}{K_w}}$$

Abb. 1. Dissoziationsverhältnisse eines basischen Farbstoffes mit der Dissoziationskonstante  $10^{-7}$  in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung. Abszisse: pH-Wert der Lösung. Ordinate: Dissoziationsrest.



Darin bedeutet  $K_B$  die Dissoziationskonstante der Farbbase,  $[H]$  die Wasserstoffionenkonzentration und  $K_w$  das Ionenprodukt des Wassers

( $= 10^{-14}$ ). Abb. 1 zeigt diese Beziehung, als Kurve dargestellt, und zwar für einen Farbstoff mit der  $K_B$   $10^{-7}$ . (Das entspricht etwa dem Neutralrot.) Bei einem ganz bestimmten, für jeden Farbstoff durch seine Dissoziationskonstante festgelegten pH-Wert, der sogenannten Halbwertsstufe ( $\text{pH} = -\log \frac{K_W}{K_B}$ , im betrachteten Falle also  $\text{pH} = 7$ ), liegt die Hälfte des Farbstoffes als Ion, die andere Hälfte als undissoziiertes Molekül vor. Ist der pH-Wert um 1 größer, dann sind rund 90% des Farbstoffes undissoziiert, ist er um 2 größer, dann sind es etwa 99%, wieder in der nächsten Stufe 99,9% usw. Bei dem um 1 unter der Halbwertsstufe liegenden pH-Wert beträgt dagegen dieser Dissoziationsrest rund 10%, in der folgenden Stufe 1%, in der nächsten 0,1% usw. Für eine Base von anderer  $K_B$  gilt eine ganz gleichartige Kurve, die lediglich parallel zur Abszisse so lange verschoben wird, bis die Abszisse des Punktes halber Dissoziation mit dem Wert  $-\log \frac{K_W}{K_B}$  übereinstimmt<sup>1</sup>.

## II. Berechnung der Ionenspeicherung eines basischen Farbstoffes in einem leeren Zellsaft

### A. Gepufferter Zellsaft

Die der Zelle gebotene Farblösung enthält also zwei in ihrem physiologischen Verhalten sehr verschiedene Bestandteile: Die ausgeprägt hydrophilen Farb-Kationen, die nicht imstande sind, durch das lebende Plasma hindurchzudringen, und die stark lipophilen Moleküle der undissoziierten Farbbase, die durch das lebende Protoplasma fast widerstandslos permeieren können. Die Farbbase wird daher sehr rasch in den Zellsaft eindringen und dort, je nach den angetroffenen Bedingungen, mehr oder weniger stark dissoziieren. Es handelt sich hierbei um eine sehr merkwürdige Form der Diffusion: Obwohl in der gebotenen Farblösung wie im Zellsaft nun beide Formen des Farbstoffes vorhanden sind, gibt es eine Diffusionsmöglichkeit und damit ein Diffusionsgefälle nur für die undissoziierten Moleküle. Die Diffusion wird so lange weitergehen, bis die Konzentration dieser Farbbasen-Moleküle im Zellsaft ( $[\text{FB}]_Z$ ) genau so groß wird wie die entsprechende Konzentration in der Außenlösung ( $[\text{FB}]_L$ ), und zwar ganz unabhängig davon, wie sich die Gesamtkonzentration des Farbstoffes im Zellsaft ( $[\text{F}]_Z$ ) zu derjenigen in der Außenlösung ( $[\text{F}]_L$ ) verhält. Dabei wird unter geeigneten Bedingungen, nämlich dann, wenn der Zellsaft saurer ist als die Außenlösung, die Gesamtkonzentration des Farbstoffes innen größer sein als außen. Es tritt eine Farbstoffspeicherung im Zellsaft ein. Der Grad

<sup>1</sup> In diesem Zusammenhange muß erwähnt werden, daß ein in der Lösung vorhandener Anteil an undissoziierten Farbsalzmolekülen, dessen Annahme für die Erklärung mancher Ergebnisse der Vitalfärbung — vor allem bei „vollen Zellsäften“ (Höfler 1949) — notwendig erscheint, in der vorliegenden Arbeit bewußt außer acht gelassen wurde, weil er für die Farbstoffspeicherung in leeren Zellsäften keine Rolle spielen dürfte.

dieser Speicherung läßt sich am besten ausdrücken durch das Verhältnis der beiden Gesamtkonzentrationen. Also  $\text{Speicherungsgrad} = \frac{[\text{F}]_Z}{[\text{F}]_L}$ . Der

Speicherungsgrad, zu dem es bei Erreichung des Diffusionsgleichgewichtes schließlich kommt, läßt sich nun für einen Spezialfall recht leicht berechnen, für den Fall nämlich, daß der Zellsaft seine  $\text{cH}$  beim Zutritt der Farbbase nicht verändert, daß er also ideal gepuffert ist. Wieweit diese Bedingung bei realen Zellsäften tatsächlich zutreffen kann, soll erst später erörtert werden.

Nach dem weiter oben Ausgeführten heißt die Gleichgewichtsbedingung für die Farbstoffspeicherung im Zellsaft:  $[\text{FB}]_Z = [\text{FB}]_L$ . Nun ist  $[\text{FB}]_Z = [\text{F}]_Z \cdot \varrho_Z$  und  $[\text{FB}]_L = [\text{F}]_L \cdot \varrho_L$ , wobei  $\varrho_Z$  und  $\varrho_L$  den Dissoziationsrest des Farbstoffes im Zellsaft bzw. in der Außenlösung bedeuten. Setzt man nun  $[\text{FB}]_Z = [\text{FB}]_L$  und setzt gleichzeitig für  $\varrho$  den im Abschnitt I. angegebenen Ausdruck ein, dann erhält man den Speicherungsgrad basischer Farbstoffe in ideal gepufferten leeren Zellsäften die Gleichung:

$$\frac{[\text{F}]_Z}{[\text{F}]_L} = \frac{K_w + K_B \cdot [\text{H}']_Z}{K_w + K_B \cdot [\text{H}']_L} \quad (1)$$

Darin ist  $K_B$  die Dissoziationskonstante des Farbstoffes,  $[\text{H}']_Z$  die Wasserstoffionenkonzentration im Zellsaft und  $[\text{H}']_L$  diejenige in der Außenlösung,  $K_w$  das Ionenprodukt des Wassers ( $10^{-14}$ ). Abb. 2 zeigt diese Funktion, in Kurvenform dargestellt, und zwar für den Fall, daß der Zellsaft pH 5 besitzt und beibehält. Auf der Abszisse sind die pH-Werte der gebotenen Farblösung aufgetragen, auf der Ordinate die Logarithmen der Speicherungsgrade im Gleichgewicht (nach unendlich langer Zeit). Es wurden fünf Kurven für Farbstoffe von verschiedenen Dissoziationskonstanten (zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-11}$ ) gezeichnet.

Die Kurvenschar läßt folgende Gesetzmäßigkeiten erkennen:

1. Wie aus der Formel ersichtlich, ist in leeren Zellsäften der Speicherungsgrad lediglich eine Funktion der  $K_B$  des Farbstoffes sowie des Innen- und Außen-pH. Er ist im hier betrachteten Falle idealer Pufferung des Zellsaftes also unabhängig von der absoluten Größe der Farbstoffkonzentrationen. Man muß also, ob die gebotene Farbstofflösung nun konzentrierter oder verdünnter ist, bei gleichem pH-Verhältnis stets das gleiche Konzentrationsverhältnis Innen-Außen erhalten.
2. Sind Innen- und Außen-pH gleich groß (im betrachteten Falle also 5), dann ist für alle Farbstoffe der Speicherungsgrad = 1, was ohne weiteres verständlich ist.
3. Die verschiedenen Kurven zeigen in ihrem Anfang einen gleichmäßigen Anstieg mit steigendem pH. Einer Erhöhung des pH um 1 entspricht eine Vergrößerung des Speicherungsgrades auf das Zehnfache.
4. Die Kurven biegen früher oder später — und zwar dann, wenn in der betreffenden Farblösung die Molekülform zu überwiegen beginnt — um und streben asymptotisch einem Maximalwert des Speicherungsgrades zu. Von diesem Speichermaximum, das eine wesentlich anschaulichere und



praktisch brauchbarere Größe darstellt als der Speichungsgrad selbst, wird weiter unten noch die Rede sein.

5. Je kleiner die Dissoziationskonstante ( $K_H$ ) des Farbstoffes ist, desto schwächer ist die pH-Abhängigkeit des Färbvorganges. Bei Farbstoffen

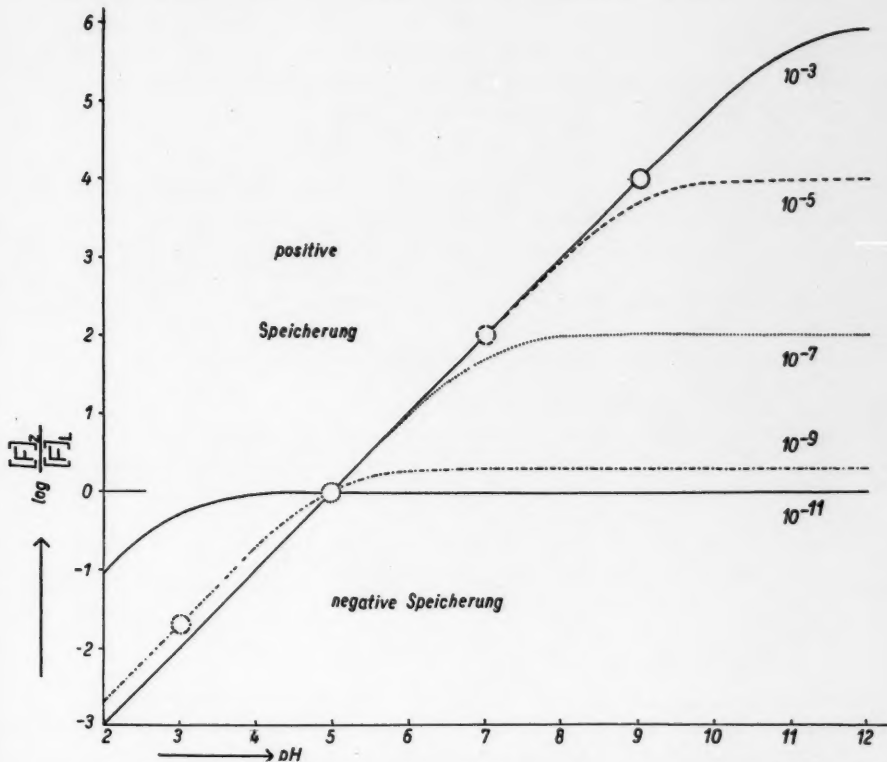


Abb. 2. Speicherung basischer Farbstoffe durch einen ideal gepufferten, leeren Zellsaft mit dem pH-Wert 5 bei verschiedenen pH-Werten der gebotenen Farblösung (Außenlösung). Abszisse: pH-Wert der Außenlösung. Ordinate: Logarithmus des Speichungsgrades im Gleichgewicht (nach sehr langer Zeit). Gezeichnet wurden fünf Kurven für verschiedene Farbstoffe mit Dissoziationskonstanten von  $10^{-3}$  bis  $10^{-11}$ . Die kleinen Kreise geben innerhalb der Kurven jeweils den Punkt an, an dem der undissoziierte Anteil des Farbstoffes 1% ausmacht.

von genügend kleiner  $K_B$  kann der Färbvorgang praktisch als pH-unabhängig betrachtet werden. Beispiel: Rhodamin B (Drawert 1939).

6. Der Bereich negativer Speicherung ( $\frac{[F]_Z}{[F]_L} < 1$ ) kann mittels der oben gegebenen Formel ebenfalls berechnet werden und ist auch in Abb. 2 enthalten. Er dürfte aber kaum praktische Bedeutung haben.

7. Die Betrachtung der Konzentrationsverhältnisse in den Farblösungen lehrt, daß bei den Färbungsvorgängen der Zeitfaktor beachtet werden muß. Da die Diffusion von Farbstoff in den Zellsaft nur durch die undissoziierten Farbbasenmoleküle vermittelt wird, muß die Diffusionsgeschwindigkeit von der Konzentration an solchen Molekülen in der Farblösung abhängen. Diese kann aber, je nach der cH, sehr verschieden sein. In der älteren Vitalfärbeliteratur werden oft Versuche wiedergegeben, in denen der Färbungseffekt nach einer bestimmten Färbedauer beschrieben und aus ihm der Schluß gezogen wird: „Der Farbstoff dringt ein“ oder: „Der Farbstoff dringt nicht ein“. Diese Auffassung ist längst dahingehend berichtigt, daß man aus dem Fehlen einer sichtbaren Speicherung natürlich nicht auf das Unvermögen des Farbstoffes, unter den herrschenden Bedingungen in die Zelle einzudringen, schließen darf. Der in die Vakuole permeierende Farbstoff kann ja auch bloß die Konzentration der Außenlösung erreichen und bleibt dann zumeist unsichtbar. Die angegebene Formel ermöglicht es jedoch, die diesbezüglichen Vorstellungen weiter zu vertiefen, und zwar, wie schon oben angedeutet, dadurch, daß sie eine grobe Abschätzung des zeitlichen Verlaufes der Farbstoffspeicherung gestattet. Ein Blick auf das Diagramm zeigt z. B., daß für den betrachteten Zellsaft von pH 5 und für einen Außen-pH=6 für alle Farbstoffe mit einer  $K_B \cdot 10^{-7}$  und größer ein Speicherungsgrad von rund 10 zu erwarten ist. Nun besteht aber ein Farbstoff der  $K_B \cdot 10^{-7}$  bei pH 6 zu etwa 10% aus undissoziierten Molekülen, ein Farbstoff der  $K_B \cdot 10^{-6}$  zu 1%, ein solcher der  $K_B \cdot 10^{-5}$  zu 0,1% usw. Wenn sich daher bei einem Farbstoff der  $K_B \cdot 10^{-7}$  das Gleichgewicht z. B. in 5 Minuten einstellt, dann muß man annehmen, daß dies bei einem Farbstoff

der  $K_B \cdot 10^{-6}$  50 Minuten

$K_B \cdot 10^{-5}$  8 Stunden

$K_B \cdot 10^{-4}$  3½ Tage

$K_B \cdot 10^{-3}$  mehr als 1 Monat dauern würde, obwohl in allen Fällen der gleiche Speicherungsgrad 10 erreicht wird, wenn sich das Gleichgewicht eingestellt hat. (Zum Vergleich:  $K_B \cdot 10^{-7}$  entspricht etwa dem Neutralrot,  $K_B \cdot 10^{-4}$  bis  $10^{-3}$  etwa dem Toluidinblau.) Im Diagramm wurde der Punkt, an dem die undissoziierte Farbbase 1% des gesamten Farbstoffes ausmacht, durch einen kleinen Kreis angedeutet. Im Bereich oberhalb dieses Kreises ist eine Einstellung der Gleichgewichte in absehbarer Zeit zu erwarten. Unterhalb desselben wird die Einstellung der Gleichgewichte länger bis sehr lange dauern, wobei es zunächst ungewiß ist, ob die lebenden Zellen die nötigen Versuchszeiten überhaupt ungeschädigt zu überdauern vermögen.

Wenn man also Pflanzenzellen in einer pH-gestuften Farbbadreihe untersucht, dann werden, streng genommen, vergleichbare Werte nur dann zu erhalten sein, wenn man den Zellen in jeder pH-Stufe die gleichen Diffusionsmöglichkeiten bietet. Diese Bedingung ist dann erfüllt, wenn das Produkt aus Molekülkonzentration und Färbezeit konstant bleibt. Färbt man daher ein Objekt in einer Lösung, die praktisch keine Ionen enthält, während der Zeit  $t$ , dann müßte man das Vergleichsobjekt in der Lösung halber Dissoziation  $2t$ , in der nächstsauren

Stufe 10 t, in der nächsten 100 t, in der nächsten 1000 t lang färben, um vergleichbare Versuchsergebnisse zu erhalten.

Es wurde bereits weiter oben gezeigt, daß die Speicherung eines bestimmten Farbstoffes in einem bestimmten Zellsaft bei steigendem pH-Wert der Außenlösung einem Maximum zustrebt. Dieses Maximum ist dann erreicht, wenn der Anteil der undissoziierten Farbbasenmoleküle in der Außenlösung praktisch 100% beträgt, also etwa zwei pH-Stufen oberhalb des Umschlagspunktes des Farbstoffes. Dies ist die günstigste Speicherbedingung, die für den betreffenden Fall möglich ist. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes der Farblösung hat auf den Färbevorgang selbst praktisch keinen Einfluß mehr (siehe auch Abb. 2). Die Berechnung der Höhe des Speichermaximums ist nicht schwierig: Man braucht nur in der Grundformel für den Speicherungsgrad (Formel 1, S. 56) den Wert für  $[H']_L$  gegen Null gehen zu lassen. Dann bleibt im Nenner nur mehr  $K_W$  übrig, und der ganze Ausdruck läßt sich schließlich auf folgende Form bringen:

$$\left(\frac{[F]_Z}{[F]_L}\right)_{\max} = 1 + \frac{K_B}{K_W} \cdot [H']_Z \quad (2)$$

Eine graphische Darstellung dieser Beziehung, die nun das Speichermaximum basischer Farbstoffe in ideal gepufferten, leeren Zellsäften wiedergibt, bringt Abb. 3.

Weder Formel noch Kurve enthalten diesmal den Außen-pH. Dieser ist ja durch die Definition des Speichermaximums festgelegt: Der Farbstoff muß in praktisch völlig undissoziiertem Zustande geboten werden. Dazu ist es notwendig, daß der pH-Wert der Lösung bedeutend (womöglich um etwa zwei pH-Stufen) über dem Umschlagspunkt (der Halbwertstufe) des Farbstoffes liegt. Dadurch fällt die für Abb. 2 erwähnte Schwierigkeit der zeitlichen Nichtvergleichbarkeit verschiedener Kurvenpunkte hier weg. Alle Farbstoffe besitzen gleiche Diffusionsmöglichkeiten. Gleiche Speicherungsgrade werden daher (theoretisch) in gleichen Zeiten erreicht.

Auf der Abszisse dieses Diagrammes ist zum Unterschied von Abb. 2 der Logarithmus der  $K_B$  des Farbstoffes aufgetragen, auf der Ordinate der Logarithmus des erreichbaren Speichermaximums. Es wurden drei Kurven für Zellsäfte von verschiedenen pH-Werten gezeichnet. Eine Betrachtung dieser Kurven lehrt folgendes:

1. Farbstoffe von relativ hoher  $K_B$  ( $10^{-3}$ ) können theoretisch ganz außerordentlich hohe Speicherungsgrade erreichen. Im Diagramm sind nur die Werte bis 10.000 enthalten, doch läßt sich durch Verlängerung der Kurven leicht zeigen, daß unter entsprechenden Bedingungen noch wesentlich höhere Speichermaxima zu errechnen sind. So hohe Speicherungsgrade werden freilich in der Praxis niemals erreicht, und es taucht die Frage nach der Ursache der Diskrepanz zwischen Theorie und Praxis auf. Die Antwort ergibt sich leicht, wenn man bedenkt, daß die Grundgleichung (Formel 1, S. 56) nur für den Fall gilt, daß der pH-Wert des Zellsaftes sich während des Färbevorganges nicht ändert, also für ideal gepufferte Zellsäfte. In der Praxis wird natürlich die Pufferkapazität der Zellsäfte eine Grenze haben. Die Azidität des Zellsaftes wird sich, wenn eine gewisse Menge Farbbase

eingedrungen ist, nach der alkalischen Seite hin verschieben und das Gleichgewicht wird früher, als es der Theorie entspricht, erreicht werden. Vielleicht läßt sich durch einen Vergleich des theoretischen und des praktischen Speicherungsgrades die Pufferkapazität des Zellsafts abschätzen. (Über die Verhältnisse in ungepufferten Zellsäften vgl. S. 65.)

2. Farbstoffe mit einer sehr kleinen  $K_B$  (unter  $10^{-11}$ ) können von keinem der drei angeführten Zellsäfte in nennenswertem Ausmaße

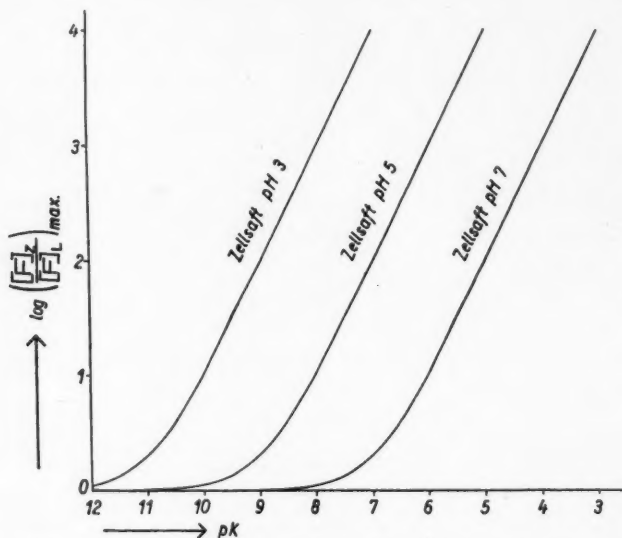


Abb. 3. Speichermaxima verschiedener basischer Farbstoffe in ideal gepufferten, leeren Zellsäften. Abszisse:  $pK$ , d. i. der negative Logarithmus der Dissoziationskonstanten des Farbstoffes. (Die Dissoziationskonstanten  $K_B$  selbst betragen demnach  $10^{-12}$  bis  $10^{-3}$ .) Ordinate: Logarithmus des Speichermaximums. (Die  $pH$ -Werte der gebotenen Farblösungen sind dabei durch die Definition des Speichermaximums bestimmt: Jeder Farbstoff muß in nahezu vollständig undissoziierter Form vorliegen, d. h. die gebotene Farblösung muß um ein bis zwei Stufen alkalischer sein als die Lösung, in der der betreffende Farbstoff seine Halbwertsstufe zeigt.)

Gezeichnet wurden drei Kurven für Zellsäfte mit verschiedenen  $pH$ -Werten.

gespeichert werden. Da Zellsäfte mit einem  $pH$ -Wert unter 3 im Pflanzenreiche kaum zu erwarten sind, darf gesagt werden, daß solche Farbstoffe (Beispiel: Rhodamin B) von leeren Zellsäften praktisch überhaupt nicht gespeichert werden können, sondern nur bis knapp über die Konzentration in der Außenlösung einzudringen vermögen. Speichert ein Zellsaft einen solchen Farbstoff, dann kann mit Sicherheit gesagt werden, daß dies nicht auf Grund des hier behandelten Ionenfallenmechanismus erfolgt, sondern daß der Zellsaft irgendwelche Stoffe enthält, die mit dem betreffenden Farbstoff eine chemische Bindung eingehen können.

3. Interessant ist das Verhalten der Farbstoffe mittlerer  $K_B$ . Ein Blick auf das Diagramm zeigt, daß jeder Zellsaft nur Farbstoffe speichern kann, deren  $K_B$  oberhalb eines bestimmten Wertes liegt. Ein Zellsaft mit dem pH-Wert 5 kann z. B. einen Farbstoff mit der  $K_B$   $10^{-10}$  nur bis zum Speicherungsgrade 1,1 anreichern. Diese Konzentrationserhöhung ist sicher unsichtbar. Ein Farbstoff mit der  $K_B$   $10^{-9}$  kann bis zum Speicherungsgrade 2 aufgenommen werden, doch wird ein Zellsaft, dessen Farbstoffkonzentration doppelt so groß ist wie die der Außenlösung, wahrscheinlich auch noch ungefärbt erscheinen, weil ja die in der Vitalfärbung üblichen Farbstofflösungen in einer so dünnen Schichte, wie sie durch die Dimensionen der Zellen gegeben ist, zumeist noch nicht als gefärbt erkennbar sind. (Die Verwendung stärkerer Lösungen, die eventuell auch schon in dünner Schicht gefärbt erscheinen würden, ist zumindest bei den basischen Farbstoffen nicht möglich, da sie alle mehr oder weniger stark giftig sind.) Ein Farbstoff mit der  $K_B$   $10^{-8}$  wird von dem in Rede stehenden Zellsaft (pH 5) maximal elffach gespeichert. Hier wird der Zellsaft, wenn man einen tinktionskräftigen Farbstoff anwendet, wohl schon leicht gefärbt erscheinen. (Bei weniger tinktionskräftigen Farbstoffen wird vielleicht die hundertfache Außenkonzentration notwendig sein, um die Speicherung sichtbar werden zu lassen. Dieses Verhältnis wird wohl von Fall zu Fall ausprobiert werden müssen.) Ein Zellsaft mit dem pH-Wert 7 dagegen kann erst einen Farbstoff mit der  $K_B$   $10^{-6}$  zu demselben Speicherungsgrade 11 anreichern. Dabei sei nochmals erwähnt, daß es sich hierbei um Maximalwerte der Speicherung aus Lösungen, die praktisch nur mehr undissoziierte Farbbasenmoleküle enthalten, handelt. Zum Vergleich: Chrysoidin  $K_B$  um  $10^{-9}$ , Neutralrot<sup>2</sup>  $K_B$   $10^{-6,6}$ , Brillantkresylblau  $K_B$  um  $10^{-4}$ .

Für die Praxis bedeutet das also: Ein leerer Zellsaft mit dem pH-Wert 5 ist auch unter optimalen Färbebedingungen nicht imstande, einen basischen Farbstoff, dessen  $K_B$  kleiner als  $10^{-8}$  ist, sichtbar zu speichern. Ein Zellsaft mit dem pH-Wert 7 kann einen Farbstoff, dessen  $K_B$  kleiner als  $10^{-6}$  ist, nicht sichtbar speichern, usw. Für Farbstoffe, die diese  $K_B$ -Grenze überschreiten, steigt dann die Speicherfähigkeit des Zellsaftes mit steigender Farbstoff- $K_B$  sehr rasch.

Es wurde schon oft der Versuch gemacht, mit Hilfe von Farbstoffen die Azidität von Zellbestandteilen festzustellen. Was läßt sich nun auf Grund der hier dargestellten Gesetzmäßigkeiten zu dieser Möglichkeit — selbstverständlich nur soweit sie sich auf den Zellsaft bezieht — sagen? Die einfachste Methode, um den pH-Wert eines Zellsaftes festzustellen, scheint

<sup>2</sup> Dies ist der einzige Wert für die Dissoziationskonstante eines in der Vitalfärbung üblichen basischen Farbstoffes, die mir aus der Literatur bekannt geworden ist (Collander, Lönegren und Arhimo 1943, S. 530 bzw. Küster-Thiel-Fischbeck 1947, S. 170). Die übrigen angegebenen  $K_B$ -Werte wurden aus den Drawertschen Ausschüttelungs- und Elektrophoreseversuchen grob geschätzt (Drawert 1940). Es handelt sich übrigens bei den meisten basischen Farbstoffen um Verbindungen mit mehreren basischen Gruppen. Die angegebenen Werte dürften wohl der ersten Dissoziationskonstante entsprechen.

zunächst die Behandlung der Zellen mit einem permeierfähigen pH-Indikator zu sein. Für die älteren Autoren stand es fest, daß die innerhalb der Zellen zu beobachtenden Farben den bei der kolorimetrischen pH-Bestimmung *in vitro* erhaltenen Farbtönen durchaus gleichzusetzen seien. In jüngerer Zeit stellte Strugger (1941) die intrazelluläre pH-Messung mit Fluoreszenzindikatoren in den Vordergrund seiner in anderer Hinsicht so erfolgreichen Arbeit. Der Versuch der pH-Messung verlief aber, wie er selbst feststellte, noch negativ. Aber auch zu den oben erwähnten, so zahlreichen kolorimetrischen pH-Bestimmungen mit Hellfeldfarbstoffen müssen wir ein großes Fragezeichen setzen, seit Lison (1935) festgestellt hat, daß es auch Farbtonänderungen basischer Farbstoffe gibt, die gar nichts mit dem pH-Wert des Mediums, in dem sie sich befinden, zu tun haben. Er konnte zeigen, daß bestimmte „chromotrope Substanzen“, wie er sie nannte, manchen basischen Farbstoffen einen Farbton verleihen, den sie normalerweise nur in alkalischer Lösung zeigen. Solche Substanzen sind nach Lison vor allem Schwefelsäureester von Kohlehydraten, wie sie im Tierreiche im Knorpel und bei den Pflanzen in vielen Schleimen und Gallerten, z. B. im Agar-Agar, vorkommen. Bank und Bungenberg (1939) konnten nachweisen, daß diese metachromatischen Erscheinungen viel verbreiteter sind, als Lison glaubte. Alle sauren Kolloide scheinen nämlich die Fähigkeit zu solchen Farbtonänderungen zu besitzen, nur in verschieden ausgeprägtem Maße. (Die Schwefelsäureester haben die stärkste Wirkung, andere saure Kolloide wirken schwächer.) Diese Art von Metachromasie ist übrigens jedem Vitalfärber von der Membranfärbung lebender Zellen her bekannt: Die Zellwände färben sich sehr oft mit blauen Farbstoffen (Methylenblau, Brillantkresylblau) violett, mit Neutralrot ziegelrot. Dies sind aber die Farbtöne, die die betreffenden Farbstoffe in alkalischer Lösung annehmen. Hier werden sie wohl durch die in der Zellwand vorhandenen Pektinstoffe, die ja auch saure Kolloide sind, bedingt. Da aber nach Bank und Bungenberg solche Metachromasie-Effekte auch in kolloidhaltigen Lösungen zu beobachten sind, erscheint die Möglichkeit zur kolorimetrischen pH-Messung im Zellinneren praktisch völlig in Frage gestellt. In den Zellsäften sind ja kolloidale Stoffe durchaus zu erwarten, z. T. auch mit Leichtigkeit nachzuweisen. Man denke etwa an die pektinreichen Fruchtpreßsäfte (Ehrlich 1932) sowie an die festen Zellsäfte von Borraginoideen-Blüten (Weber 1954, Hofmeister 1940). Das Problem der „vollen“ Zellsäfte, in denen der chemisch gebundene Farbstoff wieder andere Farbtonänderungen erleiden kann (vgl. Wiesner 1952), soll hier nicht behandelt werden.

Eine weitere Möglichkeit, den pH-Wert von Zellsäften — zumindest von „leeren“ — *in vivo* zu messen, scheint durch das in der vorliegenden Arbeit (Formel 1, S. 56) angeführte Speichergesetz gegeben zu sein. Es besagt nämlich, daß Ionenspeicherung nur dann möglich ist, wenn die angewandte Farblösung alkalischer ist als der Zellsaft. Nun bietet sich eine sehr verlockende Möglichkeit: Wie aus der Vitalfärbetechnik bekannt, (vgl. Strugger 1949, S. 151), erhält man bei Behandlung von Zellen mit Farblösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration recht scharfe Färbeschwelen. Oberhalb eines bestimmten pH-Wertes dieser Außenlösung beginnt sich der



Zellsaft anzufärben. Könnte das nun nicht der Punkt sein, an dem der pH-Wert der Lösung denjenigen des Zellsaftes zu überschreiten beginnt?<sup>3</sup> Bei näherer Betrachtung zeigt sich aber, daß die Dinge nicht so einfach liegen. Zunächst gibt es zwei Färbeschwellen, die scharf auseinandergehalten werden müssen: 1. Eine absolute Färbeschwelle, die mit der eben besprochenen identisch ist. Wenn die Außenlösung saurer ist als der Zellsaft, kann es zu keiner Ionenspeicherung kommen. 2. Eine relative Färbeschwelle. Auch wenn die Außenlösung alkalischer ist als der Zellsaft, kann dessen Anfärbung zunächst ausbleiben, und zwar bei Farbstoffen mit relativ großer  $K_B$ . Toluidinblau z. B. ( $K_B$  um  $10^{-3}$ ) hat seinen Umschlagspunkt in der Gegend von pH 11. Wird nun ein Zellsaft mit dem pH-Wert 5 mit einer Toluidinblaulösung von pH 7 behandelt, dann besitzt zwar der Zellsaft dieser Lösung gegenüber die Fähigkeit zur Farbspeicherung, aber das Gleichgewicht wird sich, weil in der Farblösung unter diesen Bedingungen nur 0,01% des Farbstoffes in undissoziierter Form vorliegt, außerordentlich langsam einstellen (vgl. S. 58). Jedenfalls wird im üblichen Viertelstundenversuch der Zellsaft ungefärbt bleiben. Bei Anwendung stärker alkalischer Farblösungen wird einmal der Punkt in der pH-Skala erreicht werden, an dem in der Außenlösung genügend undissoziierte Moleküle vorhanden sind, um auch innerhalb der üblichen Versuchszeiten schon eine Farbstoffspeicherung im Zellsaft zustande kommen zu lassen. Die so erhaltene Färbeschwelle hat natürlich gar nichts mit irgendwelchen Eigenschaften des Zellsaftes zu tun, sondern ist lediglich durch die Dissoziationsverhältnisse des Farbstoffes bedingt. Sie wurde hier relative Färbeschwelle genannt, weil sie sicherlich von der Versuchszeit abhängig ist.

Nun soll an Hand dieser Vorstellungen das Problem der intrazellulären pH-Messung weiter diskutiert werden. Die weiter oben angeführte Möglichkeit, die in pH-gestuftten Farblösungsreihen auftretende Färbeschwelle als Maß für den Zellsaft-pH zu verwenden, wird durch die eben angestellten Überlegungen bedeutend kompliziert. Wohl kann man von einer Färbeschwelle im stark alkalischen Gebiet, die etwa mit dem Umschlagspunkt des Farbstoffes zusammenfällt, mit großer Wahrscheinlichkeit sagen, daß sie mit der relativen Färbeschwelle identisch ist. Tritt eine solche Schwelle aber im Neutralbereich auf, wie z. B. der bekannte Membran-Vakuolen-Umschlagspunkt des Neutralrot (Strugger 1956), dann ist es schwierig, zu sagen, ob es sich hier um die absolute oder die relative Schwelle handelt, weil beide in diesem Bereich zu erwarten sind. Bei Farbstoffen mit noch kleinerer  $K_B$  (z. B. Chrysoidin) ist nun auch bei neutraler und schwach saurer Reaktion der Farblösung so viel undissoziiertes Molekül vorhanden, daß eine Beobachtung der absoluten Färbeschwelle möglich erscheint. Jedoch ein Blick auf die Speichermaximumkurve (Abb. 5) zeigt, daß z. B. ein Zellsaft mit dem pH-Wert 5 einen Farbstoff der  $K_B$   $10^{-9}$  nur bis zu einem

<sup>3</sup> Genau genommen wird, der erwähnten Formel entsprechend, an der Färbeschwelle der pH-Wert der Außenlösung wohl schon um 1 bis 2 Stufen über dem des Zellsaftes liegen, da, wie bereits früher gesagt, erst zehn- bis hundertfache Speicherung des Farbstoffes sichtbar werden dürfte.

maximalen Speicherungsgrad 2 anreichern kann. Nun ist es schon an sich fraglich, ob eine so geringe Anreicherung im Mikroskop sichtbar sein wird. Darüber hinaus aber wird bei einem so geringen Speichervermögen des Zellsaftes bereits das Plasma mit dem Zellsaft in Konkurrenz treten, sich mit diesem Farbstoff anfärben und die schwache Vakuolenfärbung überdecken (vgl. Drawert 1951, S. 103). Daher erscheint auch diese Möglichkeit zur intrazellulären pH-Messung wenig aussichtsreich.

Eine dritte Möglichkeit ergibt sich aus Abb. 3. Sie zeigt, daß jeder leere Zellsaft nur Farbstoffe, deren  $K_B$  über einem bestimmten Mindestmaß liegt, merklich speichern kann. Nimmt man an, daß der Speicherungsgrad 2 noch unsichtbar, der Speicherungsgrad 11 dagegen schon sichtbar ist, dann liegt für einen Zellsaft mit dem pH-Wert 3 die Grenze bei der Farbstoff- $K_B$   $10^{-10}$ , für einen Zellsaft mit dem pH-Wert 5 bei der Farbstoff- $K_B$   $10^{-8}$ , für einen Zellsaft mit dem pH-Wert 7 bei der Farbstoff- $K_B$   $10^{-6}$ . Hätten wir nun eine Reihe von chemisch möglichst ähnlichen Farbstoffen mit abgestuften Dissoziationskonstanten, dann wäre folgendes Verfahren denkbar: Eine bestimmte Art von Zellen mit leeren Zellsäften wird mit Lösungen dieser Farbstoffe behandelt, und zwar so, daß jeder Farbstoff in dem pH-Bereiche angewandt wird, in dem er nahezu vollständig undissoziiert ist. Dabei würde sich wahrscheinlich zeigen, daß nur Farbstoffe, deren  $K_B$  über einem bestimmten Mindestwert liegt, merklich gespeichert werden können. Bestünde nun überdies die Möglichkeit, den Speicherungsgrad in einem Falle, da er relativ klein ist, zu messen (bei größeren Speicherungsgraden ist ja eine Überschreitung der Pufferkapazität des Zellsaftes zu befürchten), dann ließe sich vielleicht der pH-Wert des Zellsaftes ziemlich genau feststellen. Dabei würde es sich aber wohl nur um einen Höchstwert für die Azidität des Zellsaftes handeln, da ja schwerlich die Möglichkeit ausgeschlossen werden kann, daß neben der Ionenfallenwirkung in geringem Maße auch andere Bindungskräfte an der Speicherung des Farbstoffes mitwirken. Die für dieses Verfahren nötige Farbstoffreihe steht uns freilich noch nicht zur Verfügung, aber ihre Beschaffung ist keine grundsätzliche Unmöglichkeit.

Übrigens haben am hiesigen Institut bereits Diskus und Kiermayer (1954) unabhängig von meinen Überlegungen Ansätze zur Verwendung einer solchen Methode entwickelt. Sie fanden, daß bei der Orchidee *Haemaria discolor* die Vakuolen der Subepidermiszellen alle von ihnen verwendeten basischen Farbstoffe (Neutralrot, Brillantcresylblau, Toluidinblau, Acridinorange) zu speichern vermögen, die Vakuolen der Raphidenzellen aber innerhalb kürzerer Zeit nur Brillantcresylblau und Toluidinblau. Die Autoren schlossen aus diesem Befund sehr richtig, daß die Azidität der Raphidenzellen-Vakuolen zu gering sein könnte, um einen Farbstoff mit mittlerer  $K_B$ , etwa Neutralrot, zur Dissoziation zu veranlassen. Farbstoffe mit größerer  $K_B$  (wie die beiden blauen Farbstoffe) können aber wohl auch hier schon dissoziieren und als Ionen gespeichert werden. Die in der genannten Arbeit vorgenommene Schätzung des Absolutwertes für den Zellsaft-pH steht freilich auf zu geringer experimenteller Grundlage.

## B. Ungepufferter Zellsaft

Wenn mit Hilfe eines theoretischen Gedankenganges die Entscheidung darüber getroffen werden sollte, ob die pflanzlichen Zellsäfte im allgemeinen gepuffert oder ungepuffert sind, so würde sich der erstere Fall wohl als wahrscheinlicher erweisen. Die organischen Säuren nämlich und ihre Salze, wie sie in Zellsäften so häufig vorkommen, sind Musterbeispiele für Substanzen mit Pufferwirkung und werden auch in der Praxis als solche verwendet. Aber auch die Ergebnisse der Vitalfärbung sprechen, wie später noch erörtert werden soll, häufig für eine mehr oder weniger gute Pufferung der Zellsäfte. In anderen Fällen freilich (Beispiel: *Chlorobotrys*, S. 68) muß auch das Fehlen einer Pufferung des Zellsaftes in Betracht gezogen werden. Daher muß in der vorliegenden Arbeit auch auf die Ionenspeicherung ungepufferter Zellsäfte eingegangen werden. Die rechnerische Behandlung dieses Falles ist jedoch schwieriger als die des erstgenannten und ist, wenn man den mathematischen Apparat nicht ungebührlich anschwellen lassen will, nur unter Einführung von Hilfsannahmen näherungsweise möglich. Vor allem ist sie in einer solchen vereinfachten Form nicht allgemein für Farbstoffe von beliebiger  $K_B$  durchführbar. Es muß vielmehr eine Trennung in drei Gruppen vorgenommen werden.

### a) Farbstoffe mit sehr kleiner $K_B$

Farbstoffe, die auch in mäßig saurer Lösung noch nahezu völlig undissoziiert sind (manche Rhodamine), können die  $\text{cH}$  des Zellsaftes nicht wesentlich ändern. Für sie wird daher auch hier die Formel 1 (S. 56) gelten. Solche Farbstoffe werden also von allen leeren Zellsäften, von gepufferten und ungepufferten, praktisch nicht gespeichert werden.

### b) Farbstoffe mit mittlerer $K_B$ (um $10^{-7}$ )

Trifft die durch das Plasma eindringende Farbbase auf einen ungepufferten, sauren Zellsaft, dann wird sie mit der vorhandenen Säure ein Salz bilden. Dabei werden  $\text{H}^+$ -Ionen verbraucht, wodurch der pH-Wert des Zellsaftes in Richtung des Neutralpunktes verschoben wird. Zur rechnerischen Behandlung dieses Vorganges muß ein theoretisch einfacher Fall eines völlig ungepufferten Zellsaftes angenommen werden. Diese Voraussetzung erfüllt am besten die reine wässrige Lösung einer einbasischen, starken Säure. Bei einem pH-Wert 5 würde dieser hypothetische Zellsaft dann  $10^{-5}$  Mol einer solchen Säure enthalten. Wie müßte sich ein solcher Zellsaft nun bei Behandlung der Zelle mit den üblichen Farb-Puffer-Reihen verhalten?

Der Zellsaft wird zunächst eine bestimmte Menge der Farbbase aufnehmen, die seinem Säuregehalt äquivalent ist. An diesem Äquivalenzpunkt werden in dem Zellsaft die gleichen Verhältnisse herrschen wie in einer reinen Lösung des Farbsalzes. Das Salz wird mehr oder weniger stark hydrolysieren, wodurch außer den Farbkationen und den Säure-Anionen noch eine gewisse Menge freier Farbbase und freier Säure in der Lösung

bestehen bleibt. Dringt noch mehr Farbbase ein, dann kann ohne zu großen Fehler angenommen werden, daß eine der Konzentration am Äquivalenzpunkt entsprechende Menge Farbstoff als dissoziiertes Salz vorliegt, während die darüber hinaus im Zellsaft befindliche Farbbase völlig undissoziiert ist<sup>4</sup>. Das Gleichgewicht wird natürlich auch hier dann erreicht, wenn die Konzentration an undissoziierter Farbbase innen und außen gleich groß ist. Der Farbstoffgehalt des Zellsaftes im Gleichgewicht erreicht daher den Wert der ursprünglichen Säurekonzentration des hypothetischen Zellsaftes, vermehrt um die in der Außenlösung vorhandene Konzentration an undissoziierter Farbbase. Mathematisch läßt sich dieser Sachverhalt folgendermaßen ausdrücken:

Wenn man die Anfangs-Säurekonzentration des Zellsaftes (deren Wert, da ja eine starke Säure in Betracht gezogen wurde, gleichzeitig seiner cH entspricht) als  $[H]_A$  bezeichnet und die Außenkonzentration an undissoziierter Farbbase mittels der Michaelisschen Dissoziationsrestformel (S. 54) zu

$$[FB]_L = [F]_L \cdot \varrho = \frac{[F]_L}{1 + K_B \cdot \frac{[H]_L}{K_W}}$$

bestimmt, dann erhält man für die Gesamt-Innenkonzentration an Farbstoff nach den weiter oben wiedergegebenen Vorstellungen den Ausdruck:

$$[F]_Z = [H]_A + [FB]_L = [H]_A + \frac{[F]_L}{1 + K_B \cdot \frac{[H]_L}{K_W}}$$

Dividiert man denselben noch durch  $[F]_L$ , dann ergibt sich für den Speicherungsgrad basischer Farbstoffe mit mittlerer  $K_B$  in ungepufferten, leeren Zellsäften die Formel:

$$\frac{[F]_Z}{[F]_L} = \frac{[H]_A}{[F]_L} + \frac{1}{1 + K_B \cdot \frac{[H]_L}{K_W}} \quad (5)$$

Darin bedeutet:

$[F]_Z$  die Gesamtkonzentration des Farbstoffes im Zellsaft

$[F]_L$  die Gesamtkonzentration des Farbstoffes in der Außenlösung,

$[FB]_L$  die Konzentration an undissoziierter Farbbase in der Außenlösung,

$[H]_A$  die Wasserstoffionenkonzentration im ungefärbten Zellsaft bzw. seine hypothetische Säurekonzentration,

$[H]_L$  die Wasserstoffionenkonzentration in der Außenlösung,

$K_B$  die Dissoziationskonstante des Farbstoffes,

$K_W$  des Ionenproduktes des Wassers ( $= 10^{-14}$ ).

<sup>4</sup> Bei Farbstoffen mit sehr kleiner  $K_B$  wird die erste Annahme (daß nämlich das Farbsalz völlig dissoziiert ist) nicht zutreffen, bei Farbstoffen mit sehr großer  $K_B$  die zweite Annahme (daß die darüber hinaus im Zellsaft befindliche freie Farbbase völlig undissoziiert ist). Daher gelten diese Vorstellungen, wie bereits erwähnt, nur für Farbstoffe mit mittlerer  $K_B$ .

Die Formel gilt, wie aus ihrer Ableitung hervorgeht, nur im Gebiet oberhalb des Äquivalenzpunktes, d. h. dann, wenn im Gleichgewicht die Farbstoffkonzentration im Zellsaft größer ist als seine ursprüngliche Säurekonzentration. Gleichgewichte, die unterhalb des Äquivalenzpunktes liegen, sind bei sehr sauren Zellsäften sowie bei sehr geringen Außenkonzentrationen an Farbstoff zu erwarten. Doch zeigt eine eingehendere Betrachtung der Verhältnisse, daß der Fehler, der entsteht, wenn die Formel auch dann noch angewandt wird, nicht sehr groß ist. Dies ist besonders im Hinblick auf Abb. 5 wichtig, bei der auch extrem saure Zellsäfte in Betracht gezogen wurden. Die wahren Werte für die Speicherungsgrade werden in diesem Falle im stark sauren Bereich etwas unter den aus der Formel errechneten und auf der Abbildung dargestellten liegen.

Abb. 4 gibt eine graphische Darstellung der Formel 3 für einen Farbstoff mit der  $K_R$   $10^{-7}$  in der Außenkonzentration  $10^{-3}$  Mol gegenüber einem Zellsaft mit dem pH-Wert 5. (Zum Vergleich: Eine Neutralrotlösung  $10^{-3}$  Mol hat die Gewichtskonzentration 1 : 3470 bzw. 0,029%). Der Äquivalenzpunkt wurde mit A bezeichnet. Die Speicherverhältnisse an diesem Punkte wurden mit Hilfe des Hydroysengleichgewichtes (Michaelis S. 75) berechnet. In das gleiche Schema wurde die entsprechende Kurve für ideal gepufferten Zellsaft eingezeichnet (gestrichelt).

Das Diagramm lehrt, daß die Speicherung in dem ungepufferten Zellsaft weit hinter derjenigen in dem entsprechenden gepufferten Zellsaft zurückbleibt, ja daß es im hier betrachteten Falle (Zellsaft-pH 5) auch bei extrem alkalischen Außen-pH überhaupt zu keiner nennenswerten Speicherung kommen kann. (Höchstwert des Speicherungsgrades 1,01. Es wird also im Zellsaft praktisch nur die Außenkonzentration erreicht.)

Der Abb. 4 gegenüber gelten die gleichen Bemerkungen, wie sie (S. 58) zur Abb. 2 gemacht wurden. An verschiedenen Punkten der Kurve enthält die Außenlösung verschiedene Mengen undissoziierter Farbbase und daher wird die Einstellung der eingezeichneten Gleichgewichtskonzentrationen verschieden lang auf sich warten lassen. Es ist nun wünschenswert, auch für diesen Fall eine der Abb. 3 analoge Beziehung aufzufinden, die die

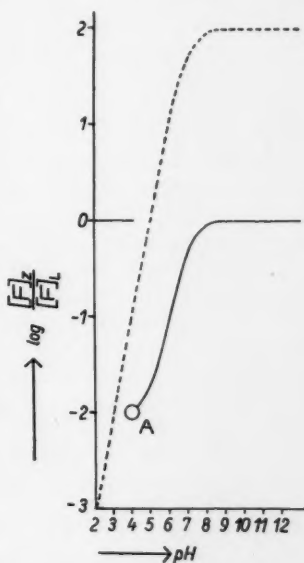


Abb. 4. Speicherung eines basischen Farbstoffes mit der Dissoziationskonstante  $10^{-7}$  in einem ungepufferten, leeren Zellsaft mit dem pH-Wert 5 für den Fall, daß der Farbstoff in der Außenkonzentration  $10^{-3}$  Mol geboten wird. Abszisse: pH-Wert der Außenlösung. Ordinate: Logarithmus des Speicherungsgrades. A = Äquivalenzpunkt. Gestrichelte Kurve: Speicherung in einem ideal gepufferten Zellsaft unter sonst gleichen Bedingungen.



Verhältnisse unter optimalen Speicherbedingungen (außen nur undissoziierte Farbbase) wiedergibt. Läßt man in der Gleichung für den Speicherungsgrad im ungepufferten Zellsaft (S. 66)  $[H']_L$  gegen Null gehen, dann nimmt der Ausdruck, der jetzt das Speichermaximum basischer Farbstoffe in ungepufferten, leeren Zellsäften (bei hohem Außen-pH) wiedergibt, folgende Form an:

$$\frac{([F]_Z)}{([F]_L)_{\max}} = 1 + \frac{[H']_A}{[F]_L} \quad (4)$$

Die graphische Darstellung dieser Gleichung gibt die Abb. 5. Die Darstellung ist gegenüber Abb. 3 insofern verändert, als nicht die  $K_B$  des Farbstoffes als Abszisse gewählt wurde (die Gleichung gilt ja nur für Farbstoffe mittlerer  $K_B$ ), sondern der pH-Wert des ungefärbten Zellsaftes ( $= -\log [H']_A$ ). Zum Vergleich wurde wieder die entsprechende Kurve für ideal gepufferten Zellsaft eingezeichnet (gestrichelt). Die Kurven zeigen zunächst die zum Teil schon aus Abb. 4 ersichtliche Tatsache, daß die Speicherungsgrade für ungepufferten Zellsaft wesentlich (bis zu 4 Zehnerpotenzen) unter denjenigen für ideal gepufferten Zellsaft liegen. Die größten Unterschiede treten bei stark sauren Zellsäften auf. Gegen den Neutralbereich zu nähern sich die Kurven immer mehr. Ein Zellsaft mit dem pH-Wert 8 kann einen Farbstoff mit der  $K_B \cdot 10^{-7}$  praktisch nicht mehr über die Außenkonzentration anreichern, ob er nun gepuffert ist oder nicht. Alkalische Zellsäfte dürften aber in der Natur kaum vorkommen. Weiter ist aus der Abbildung ersichtlich, daß auch ungepufferte Zellsäfte Farbstoffe mittlerer  $K_B$  speichern können, aber nur dann, wenn sie extrem sauer sind ( $pH < 5$ ).

Aus der Tatsache, daß ein leerer Zellsaft z. B. Neutralrot speichert, folgt nun, wenn man Abb. 5 betrachtet, eine Alternative: Entweder ist der Zellsaft gepuffert und schwach sauer oder ungepuffert und stark sauer. Der pH-Unterschied zwischen diesen beiden Möglichkeiten ist beträchtlich. Das Speichermaximum 11 wird hier von einem gepufferten Zellsaft mit dem pH-Wert 6 erreicht, ein ungepuffert Zellsaft aber muß den pH-Wert 2 besitzen, um dasselbe Speichermaximum zu erreichen.

Die auf S. 64 vorgeschlagene Methode zur intrazellulären pH-Messung ist nur auf gepufferte Zellsäfte anwendbar. Immerhin ist aus den S. 65 angeführten Gründen die Annahme, daß die Pufferkapazität der meisten Zellsäfte ausreicht, um bei geringen, eben sichtbaren Speicherungsgraden den pH-Wert aufrechtzuerhalten, soweit wahrscheinlich, daß ein Versuch, nach dieser Methode zu arbeiten, gerechtfertigt erscheint.

Es gibt aber auch Ausnahmen: Von der Alge *Chlorobotrys regularis* ist bekannt (Cholnoky und Höfler 1950, S. 160), daß sie sich mit Neutralrot niemals anfärbt. Dies könnte, wie schon in der genannten Arbeit (S. 179) vermutet wird, darauf zurückzuführen sein, daß der Zellsaft eine schwach alkalische Reaktion besitzt. Er müßte, wie ein Blick auf Abb. 5 zeigt, nicht einmal alkalisch sein. Ein gepuffert Zellsaft mit dem pH-Wert 7 kann Neutralrot nur bis zum Speichermaximum 2 anreichern. Innen gegenüber außen doppelte Farbstoffkonzentration ist sicher unsichtbar. Darüber hinaus besteht aber die Möglichkeit, daß es sich um einen unge-



pufferten Zellsaft handelt. Ein solcher könnte sogar ziemlich sauer sein, ohne daß eine Farbstoffspeicherung zustande kommt (Speichermaximum 2 bei pH 5).

### c) Farbstoffe mit großer $K_B$

Dringt eine Farbbase mit großer  $K_B$  (Beispiel: Toluidinblau) in einen ungepufferten, leeren Zellsaft, so wird sie, wie im vorhergehenden Falle, mit der vorhandenen Säure ein Salz bilden. Die darüber hinaus noch eindringende Farbbase kann nun aber nicht als undissoziiert betrachtet werden. Sie wird vielmehr, dem Massenwirkungsgesetz entsprechend, zu einem gewissen Anteile in Farb-Kationen und OH-Ionen zerfallen. Dadurch wird der Anteil an undissoziierter Farbbase gegenüber dem im vorigen Abschnitt behandelten Falle heruntergedrückt werden bzw. die Gesamt-Innenkonzentration an Farbstoff muß hier größer werden, bis die Gleichgewichtskonzentration an undissoziierter Farbbase erreicht wird. Farbstoffe mit großer  $K_B$  werden also ungepufferten Zellsäften gegenüber unter gleichen Versuchsbedingungen höhere Speicherungsgrade ergeben als Farbstoffe mit mittlerer  $K_B$ . Bei der mathematischen Behandlung dieses Falles gelangt man jedoch zu derart komplizierten Ausdrücken, daß die Aufstellung einer allgemeineren Formel unrationell erscheint. Für konkrete Einzelfälle würden sich aber bei Bedarf wohl Näherungswerte für die Speicherungsgrade errechnen lassen.

Die Betrachtung des Falles zeigt aber, daß bei Zellsäften, die infolge fehlender Pufferung unfärbbar sind (*Chlorobotrys*?), die Behandlung mit einem Farbstoff mit großer  $K_B$  in stark alkalischer Lösung das aussichtsreichste Mittel ist, um dieselben dennoch zu einer Farbstoffspeicherung zu veranlassen. Dasselbe Mittel wäre auch, wie ein Blick auf Abb. 3 zeigt, bei gepufferten Zellsäften anzuwenden, die etwa infolge zu geringer cH schlecht färbbar sind. Ganz allgemein ist also ein Farbstoff mit großer  $K_B$  in stark

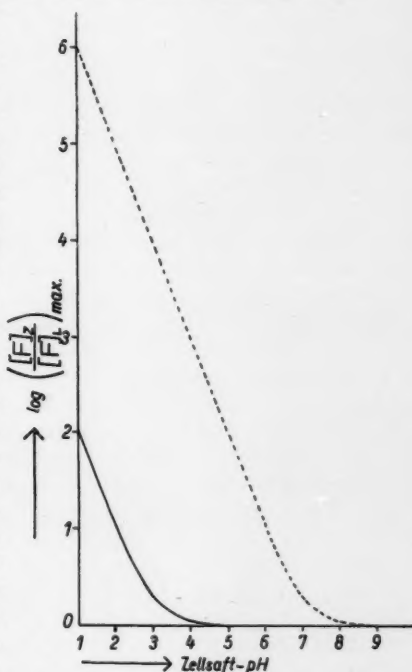


Abb. 5. Speichermaxima für einen basischen Farbstoff mit der Dissoziationskonstante  $10^{-7}$  in verschiedenen ungepufferten, leeren Zellsäften. Abszisse: pH-Wert des Zellsaftes. Ordinate: Logarithmus des Speichermaximums. (Bezüglich der pH-Werte der Farblösungen vgl. die Bemerkungen bei Abb. 3.) Gestrichelte Kurve: Die entsprechenden Speichermaxima in einem ideal gepufferten Zellsaft unter sonst gleichen Bedingungen.

alkalischer Lösung das wirksamste Mittel, um in einem leeren Zellsaft die Speicherung eines basischen Farbstoffes herbeizuführen.

### Zusammenfassung

Für leere, speicherstofffreie Zellsäfte, die basische Farbstoffe nach dem Prinzip der Ionenfallenwirkung speichern, werden auf Grund der Michaelisschen Dissoziationsrestformel vier Speichergesetze aufgestellt. (Die Ionenfallenwirkung besteht darin, daß die durch das Plasma endosmierenden Farbbasenmoleküle im sauren Zellsaft dissoziieren, wodurch ein Diffusionsgefälle für die Farbbase so lange bestehen bleibt, bis, den beiderseitigen Dissoziationsgleichgewichten entsprechend, die Konzentration an undissoziierter Farbbase im Zellsaft und in der Außenlösung gleich groß ist.)

1. Die Speicherungsgrade (als Speicherungsgrad wird das Verhältnis zwischen Innen- und Außenkonzentration an Farbstoff bezeichnet) in ideal gepufferten Zellsäften sind nach Formel 1 (S. 56) sowie Abb. 2 abhängig vom Innen- und Außen-pH und von der Dissoziationskonstante des Farbstoffes. Die Speicherungsgrade steigen für einen bestimmten Farbstoff und einen bestimmten Zellsaft mit steigendem Außen-pH zunächst gleichmäßig an, um sich dann einem Höchstwerte zu nähern, der dann erreicht wird, wenn in der Außenlösung praktisch nur mehr undissoziierte Farbbase enthalten ist. Dieser Höchstwert des Speicherungsgrades wird als Speichermaximum bezeichnet. Er liegt für Farbstoffe mit verschiedenen Dissoziationskonstanten sehr verschieden hoch.

2. Die Formel 2 (S. 59) sowie die Abb. 3 zeigen die Abhängigkeit der Speichermaxima vom Innen-pH sowie von den Dissoziationskonstanten der Farbstoffe bei ideal gepufferten Zellsäften. (Der Außen-pH ist hier für jeden Farbstoff gegeben.) Aus der Formel bzw. den Kurven geht hervor, daß jeder Zellsaft nur solche Farbstoffe positiv speichern kann, deren Dissoziationskonstante oberhalb eines bestimmten Mindestwertes liegt, der vom Innen-pH abhängig ist.

3. Die Aufstellung der entsprechenden Gesetze für ungepufferte Zellsäfte ist zunächst nur für den Fall von Farbstoffen mit mittlerer Dissoziationskonstante (um  $10^{-7}$ ) durchführbar. Formel 3 (S. 66) sowie Abb. 4 lehren, daß die Speicherungsgrade in ungepufferten Zellsäften wesentlich niedriger liegen als in ideal gepufferten. Ein Farbstoff mit mittlerer Dissoziationskonstante kann von neutralen bis mäßig sauren, ungepufferten Zellsäften überhaupt nicht sichtbar gespeichert werden.

4. Die entsprechende Gleichung für die Speichermaxima in ungepufferten Zellsäften bei Anwendung von Farbstoffen mit mittlerer Dissoziationskonstante (Formel 4, S. 68 bzw. Abb. 5) zeigt, daß ein völlig ungepufferter Zellsaft nur dann sichtbar speichern kann, wenn er stark sauer ( $\text{pH} < 5$ ) ist.

Aus verschiedenen Gründen kann angenommen werden, daß die meisten Zellsäfte mehr oder weniger gut gepuffert sind.

Im Anschluß an Formel 2 (S. 61 f.) wird die Möglichkeit einer intrazellulären pH-Messung *in vivo* diskutiert. Dazu wird eine neue Methode vorgeschlagen, die theoretisch auf gepufferte, leere Zellsäfte anwendbar ist und in einer Behandlung der Zellen mit einer Reihe chemisch möglichst ähnlicher Farbstoffe mit abgestuften Dissoziationskonstanten unter den Bedingungen des Speichermaximums besteht.

#### Literatur

- Bank, O., und H. G. Bungenberg de Jong, 1939: Untersuchungen über Metachromasie. *Protoplasma* 32, 489.
- Becker, W. A., 1936: Vitale Cytoplasma- und Kernfärbungen. Sammelreferat. *Protoplasma* 26, 439.
- Brooks, S. C., und M. M. Brooks, 1941: The permeability of living cells. *Protoplasma-Monographien* 19. Berlin.
- Cholnoky, B. v., und K. Höfler, 1950: Vergleichende Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 159, 143.
- Collander, R., H. Lönegren, und E. Arhimo, 1945: Das Permeationsvermögen eines basischen Farbstoffes, mit demjenigen einiger Anelektrolyte verglichen. *Protoplasma* 37, 527.
- Czaja, A. Th., 1934: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengewebe. II. Basische Farbstoffe. *Planta* 21, 531.
- 1937: Untersuchungen über den Membraneffekt des Absorptionsgewebes und über die Farbstoffaufnahme in die lebende Zelle. *Planta* 26, 90.
- Diskus, A., und O. Kiermayer, 1954: Die Raphidenzellen von *Haemaria discolor* bei Vitalfärbung. *Protoplasma* 43.
- Drawert, H., 1937: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. *Flora* 132, 91.
- 1938: Über die Aufnahme und Speicherung von Prune pure durch die pflanzliche Zelle. *Planta* 29, 179.
- 1939: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. *Planta* 29, 376.
- 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme... II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. *Flora* 134, 159.
- 1951: Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. *Protoplasma* 40, 85.
- Ehrlich, F., 1932: Pektin. In Kleins Handbuch der Pflanzenanalyse, III, 80. Wien.
- Höber, R., 1926: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig.
- Höfler, K., 1947 a: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasma-permeabilität und Stoffspeicherung? *Mikroskopie* 2, 13.
- 1947 b: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 156, 585.
- 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. *Biologia generalis* 19, 90.
- Hofmeister, L., 1940: Mikrurgische Studien an Borraginoideen-Zellen. *Protoplasma* 35, 65.
- Irwin, M., 1923: The penetration of dyes as influenced by hydrogen ion concentration. *Journ. gen. Physiol. (Am.)* 5, 727.
- 1926: Mechanism of the accumulation of dye in *Nitella* on the basis of the entrance of the dye as undissociated molecules. *Journ. gen. Physiol. (Am.)* 9, 561.

72 H. Kinzel: Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe usw.

- Küster-Thiel-Fischbeck, 1947: Logarithmische Rechentafeln für Chemiker, Pharmazeuten, Mediziner und Physiker. 56.—60. Aufl. Berlin.
- Lison, L., 1935: Sur la détermination du pH intracellulaire par les colorants vitaux indicateurs. L'« erreur métachromatique ». *Protoplasma* 24, 453.
- McCutcheon, M., and B. Lucké, 1924: The mechanism of vital staining with basic dyes. *Journ. gen. Physiol. (Am.)* 6, 501.
- Michaelis, L., 1922, 1927: Die Wasserstoffionenkonzentration. Ihre Bedeutung für die Biologie und die Methoden ihrer Messung. Monographien aus dem Gesamtgebiet der Physiologie der Pflanzen und der Tiere. I, Teil 1. Berlin.
- Overton, E., 1900: Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle. *Pringsh. Jahrb. wiss. Bot.* 34, 669.
- Pecksieder, M. E., 1950: Zur Frage der Farbionenpermeabilität des Protoplasmas. *Biologia generalis* 19, 224.
- Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. *Unters. bot. Inst. Tübingen II*, 179.
- Searth, G. W., 1926: The mechanism of accumulation of dyes by living cells. *Plant Physiol.* 1, 215.
- Strugger, S., 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* 26, 56.
- 1941: Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. I. Basische, zweifarbige Indikatoren. *Flora* 135, 101.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Weber, F., 1934: Vakuolenkontraktion der Borraginaceen-Blüenzellen als Synaerese. *Protoplasma* 22, 4.
- Wiesner, G., 1951: Untersuchungen über Vitalfärbung von *Allium*-Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. *Protoplasma* 40, 405.

# **Zellwandpermeabilität einiger Moose**

Von

**Richard Biebl**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

(Eingelangt am 16. Dezember 1953)

## **Einleitung**

Arbeiten aus letzter Zeit haben wieder den Einfluß der Zellwandpermeabilität auf die Geschwindigkeit osmotischer Volumveränderungen des Protoplasten zur Diskussion gestellt. Bennet-Clark und Bexon (1946) beobachteten beim Umlegen von Gewebeschnitten aus hypertonischen Rohrzuckerlösungen in isotonische Elektrolytlösungen in geschlossenen Zellen Volumschwankungen und in einseitig geöffneten Zellen Wanderungen des Protoplasten. Die beiden Forscher zogen elektrophoretische Vorgänge im Plasma zur Erklärung heran. Casari (1953), der diese Erscheinung des „Plasmolytikumwechsel-Effektes“ („change of plasmolyticum effect“) unabhängig wiederentdeckt hatte und die Versuche der beiden englischen Autoren ausführlich wiederholte, fand, daß dieser Effekt sich auch beim Austausch zweier Anelektrolyte (Rohrzucker — Harnstoff) einstellt, wo Elektrophorese nicht in Betracht kommt. Er führt die Erscheinung daher auf eine verschiedene Zellwandpermeabilität für die verwendeten Lösungen zurück: Werden plasmolysierte Zellen der äußeren oder inneren Epidermis einer *Allium-cepa*-Zwiebelschuppe aus einer Lösung mit kleinen Lösungsteilchen in eine isotonische Lösung mit größeren Lösungsteilchen gelegt, so tritt infolge verzögerten Eintrittes dieser Lösung durch die Zellwand eine vorübergehende Vergrößerung des Protoplastenvolumens ein. Im umgekehrten Fall kommt es zu einer vorübergehenden Zusammenziehung der Protoplasten. Casari greift mit seiner Deutung auf Vorstellungen von Huber und Höfler zurück, die bereits 1950 erstmalig auf den Einfluß der Zellwandpermeabilität auf Eintritts- und Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse hinwiesen.

Versuche über Strahlenwirkungen auf verschiedene Laub- und Lebermoose, bei denen Plasmolyse als Lebensreaktion angewandt wurde, zeigten

so große Verschiedenheiten im Durchtrittsvermögen der einzelnen Plasmolytika durch die Membran, daß diese Beobachtungen wert erschienen, weiterverfolgt und in einer eigenen Mitteilung behandelt zu werden.

### Material und Methode

Die Methode, molekulardisperse Lösungen verschiedener Teilchengröße zur schätzungsweisen Feststellung der Porenweite von Zellmembranen heranzuziehen und ihren Durchtritt aus dem Auftreten von Plasmolyse in hypertonen Konzentrationen zu erschließen, ist nicht neu. Frenzel (1929) hat z. B. Haare von 22 verschiedenen Blütenpflanzen in hypertonen Lösungen von Glycerin, Glukose und Rohrzucker gelegt und beobachtet, daß sich alle Haare in Glycerin, nur einige wenige in Traubenzucker und keines in Rohrzucker plasmolysieren läßt. In den Zuckerlösungen, die nicht mehr durch die Membran einzudringen vermögen, kommt es infolge des osmotischen Wasserentzuges und der damit gegebenen Volumverkleinerung des Protoplasten zu einer Eindellung der Membranen, die bis zur Berührung einander gegenüberliegender Zellwände führen kann. Solche Zellschrumpfungen in hypertonen großmolekularen Lösungen beschrieben u. a. auch Brilliant (1927) und Kressin (1935) für Blattzellen von Moosen, Jost (1929) für *Chara* und Renner (1932) und Härtel (1940) für Hymenophyllaceen, Förster (1933) für *Rhizoclonium*. Man nennt diese Erscheinung bekanntlich Cytorrhise (vgl. Küster 1951, Strugger 1949).

Die in unseren Versuchen verwendeten Substanzen haben folgende Molekulargewichte und Molekularvolumina:

	Molekulargewicht	Molekularvolumen
Raffinose . . . . .	504,35	498,8
Saccharose (Rohrzucker) . . .	342,18	345,6
Glukose (Traubenzucker) . .	180,1	185,2
Erythrit . . . . .	122,08	130,2
Glyzerin . . . . .	92,06	87,8
Harnstoff . . . . .	60,05	59,2
Formamid . . . . .	45,05	46,7

Als Versuchsmoose dienten Laub- und Lebermoose aus dem Moosparadies der luftfeuchten Umgebung des Gollinger Wasserfalls (Salzburg), das vor allem durch die Untersuchungen von Herzog und Höfler (1944) bryologisch erschlossen wurde. Die Hauptversuchsmoose waren drei *Mnium*-Arten, nämlich *Mnium rostratum* Schrad., *Mnium punctatum* Schrad. und *Mnium serratum* Schrad. *Mnium rostratum* bildete (Sommer 1953 gesammelt!) hohe, üppige Moospolster im immerfeuchten Sprühbereich des Wasserfalls, *Mnium punctatum* stammte aus den mächtigen Blockhalden eines ehemaligen, heute von hohen Fichten beschatteten Bergsturzes am Fuße des Hohen Gölls und *Mnium serratum* nahm die lichtärmsten Standorte in den Klüften dieses „Irrgartens“ (Herzog-Höfler) ein. Aus dem gleichen Gebiet, nur teilweise von helleren Lokalitäten, stammten ferner die Lebermoose *Metzgeria conjugata* (Lindb.), *Lepidozia reptans* (L.) Dum.,



*Trichocolea tomentella* (Ehrh.) Dum., *Bazzania trilobata* (Lindb.) und *Aplozia riparia* (Tayl.) Dum., sowie das Laubmoos *Rhodobryum roseum* (Weis) Schimp. An einem gleichfalls etwas trockeneren Standort im Wald oberhalb des Wasserfalls wurde *Hookeria lucens* (L.) Sm. gesammelt, während *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw. ex p.) Schwägr. an einem ständig nassen Standort eines kleinen, zwischen Steinen hinrieselnden Quellabflusses wuchs.

### Die Zellwandpermeabilität der drei *Mnium*-Arten

Es war besonders eindrucksvoll, die größten unter allen Versuchsmoosen beobachteten Unterschiede in der Zellwandpermeabilität innerhalb einer einzigen Gattung zu finden. Die Versuche wurden teils im Sommer 1955 mit standortfrischem, teils im Spätherbst in Wien mit seit dem Sommer an kühlen Nordfenstern des Instituts kultiviertem Material gemacht.

Um im Verhältnis zur Konzentration des Zellsaftes gleich<sup>1</sup> hypertonische Lösungen zu verwenden, wurde zuerst der osmotische Wert bestimmt. Da schon Traubenzucker zum Teil nicht oder schwer durch die Membranen eindrang, wurde hiezu KCl gewählt. Es ergab sich, daß alle drei Arten (*Mnium rostratum*, *Mn. punctatum* und *Mn. serratum*) in Blättern mittleren Alters standortfrischer Pflanzen einen etwa gleich hohen osmotischen Wert besaßen, der bei Grenzplasmolyse einer 0,5-Mol-KCl-Lösung entsprach. Für die Versuche zur Bestimmung der Membranwegsamkeit wurde daher eine osmotisch ungefähr doppelt so wirksame Konzentration gewählt, und zwar 1,0 Mol Rohrzucker, Traubenzucker, Erythrit und Harnstoff. Von Raffinose wurde eine 0,7-Mol-Lösung (warm gelöst, nach einigen Tagen teilweiser Ausfall!) und vom außerordentlich schnell durch das Plasma in die Vakuole permeierenden Formamid wurden Konzentrationen von 1,0 bis 4,0 Mol verwendet.

Die beiden Extreme der Membranpermeabilität zeigten *Mnium rostratum* aus der Sprühzone des Gollinger Wasserfalls und *Mnium serratum* aus den dunkelsten Klüften des „Irrgartens“.

*Mnium rostratum*. Während an Laubmoosblättchen schon häufig in Trauben- oder Rohrzuckerlösungen Cytorrhysen beschrieben werden, tritt bei *Mnium rostratum* nicht nur in 1,0 Mol Traubenzucker und Rohrzucker schon binnen kurzem Plasmolyse ein, sondern auch noch die Raffinose, deren Molekularvolumen fast eineinhalbmal so groß als das des Rohrzuckers ist, ruft schon nach 1½ Minuten Plasmolysebeginn hervor. Nach 4 Minuten sind etwa 50%, nach 12 Minuten etwa 90% aller Zellen plasmolyisiert und nach 19 Minuten zeigt das Blättchen in Raffinose 100% Plasmolyse.

Für diese Versuche wurden stets vollkommen unverletzte Blättchen mit einem Stück des tragenden Stämmchens herausgeschnitten, so daß auch kein Eindringen der Lösung durch eine verletzte Blattbasis möglich war. Es blieb ihr nur der Weg durch die äußeren Zellwände.

Der sich aus der Wegsamkeit für Raffinose, Rohr- und Traubenzucker ergebenden „Großporigkeit“ der Außenmembranen von *Mnium rostratum*

entspricht auch ein leichter und schneller Plasmolyseeintritt in Erythrit und Harnstoff. Formamid (1,0 Mol) ruft schon nach 15 Sekunden zahlreiche Plasmolysen hervor. Nach 30 Sekunden sind fast sämtliche Protoplaste schwach bikonvex. Nach 1 Minute ist bereits deutlich Plasmolyserückgang zu beobachten, nach 2 Minuten sind schon sehr viele und nach 2½ Minuten alle Zellen deplasmolysiert. Anschließend Übertragung in 1,0 Rohrzucker ruft wieder Plasmolyse hervor.

Diesem *Mnium rostratum* mit seiner extrem durchlässigen Außenmembran steht als Gegentypus eine andere *Mnium*-Art gegenüber, die die dichteste von mir unter den Moosen gefundene Membran besitzt, nämlich *Mnium serratum*. In Raffinose und Rohrzucker kommt es überhaupt zu keiner Plasmolyse. Erst nach Stunden beginnen in Rohrzucker von der Mittelrippe her Plasmaabhebungen, die zeigen, daß der Rohrzucker durch die leitenden Zellen von der Schnittfläche des Stämmchens und nicht durch die Außenmembranen in die Blättchen gelangt ist. Traubenzucker, Erythrit und Harnstoff führen in 15–20 Minuten zu Plasmolysen in der Blattfläche, dürften also vielleicht langsam auch durch die äußeren Zellwände eintreten.

Es ist eine altbekannte Tatsache (vgl. Mender 1938), daß in Trauben- oder Rohrzucker nicht plasmolysierbare Laubmoosblättchen zur Plasmolyse gebracht werden können, wenn man die Blättchen anschneidet und der Zuckerlösung von einer Schnittfläche her Eintritt gewährt. Die Zellquerswände sind für diese großmolekularen Lösungen leichter durchlässig. Sie sind also weniger dicht gebaut als die Außenmembranen. Auch in der Umgebung kleiner Verletzungen oder toter Zellen sind stets früher Plasmolysen zu beobachten als in intakten Zellflächen. Die Ursache der größeren Dichte der Außenmembranen ist im einzelnen noch nicht bekannt. Kressin (1935) hat die Membranbeschaffenheit der von ihm untersuchten Moose, darunter auch ein *Mnium splendens*, mit den verschiedensten Reagentien untersucht und niemals eine Kutikula nachweisen können. Pektinstoffe fand er nur in alten *Dicranum*- und *Mnium*-Blättchen.

*Mnium serratum* mit seiner ganz ungewöhnlich dichten Außenmembran lud dazu ein, Versuche auch mit angeschnittenen Blättchen zu machen, d. h. Vergleiche zwischen der Permeabilität der äußeren und der seitlichen Zellwände anzustellen. *Mnium serratum* ist ein zweizeilig beblättertes Laubmoos. Es wurden zu den Versuchen kleine Sproßstückchen abgeschnitten, die nach beiden Seiten hin je ein vollkommen unverletztes Blättchen trugen. Von dem einen wurde das vorderste Viertel abgeschnitten, das andere blieb intakt.

Im folgenden sei für einige der verwendeten Lösungen eine Gegenüberstellung des Plasmolyseeintrittes in den angeschnittenen und den unverletzten Blättchen gebracht. Die seit dem Sommer kultivierten Pflanzen hatten Ende November einen etwas erhöhten osmotischen Wert (Grenzplasmolyse in 0,5 Mol KCl). Es wurden die Versuchslösungen daher meist konzentrierter genommen als 1,0 Mol.

## 1,5 Mol Traubenzucker:

Zeit nach dem Einlegen	Angeschnitten	Unverletzt
1'	Keine Plasmolyse	Keine Plasmolyse
2'	Keine Plasmolyse	Keine Plasmolyse
4'	Keine Plasmolyse	Keine Plasmolyse
30'	Keine Plasmolyse	Keine Plasmolyse
1 <sup>h</sup>	Allenthalben ganz schwacher, oft noch kaum merkbarer Plasmolyseeintritt	Ebenso wie abgeschnitten
3½ <sup>h</sup>	In allen Zellen deutliche schwache Abhebungen	Ebenso wie angeschnitten

Ergebnis: Die Wegsamkeit für Traubenzucker ist für die Außen- und Seitenmembranen gleich, und zwar für beide äußerst gering.

## 1,0 Mol Erythrit:

Zeit nach dem Einlegen	Angeschnitten	Unverletzt
1'	Keine Plasmolyse	Keine Plasmolyse
1½'	In 1—4 Reihen vom Schnitt- rand Plasmolysebeginn	Keine Plasmolyse
2'	Bis 7 Reihen vom Schnittrand Plasmolysebeginn	Keine Plasmolyse
3'	Bis 9 Reihen vom Schnittrand Plasmolysebeginn	Keine Plasmolyse
5'	Bis 11 Reihen vom Schnittrand	Keine Plasmolyse
6½'	Erythrit ist auch von unten her durch die abgeschnittenen Stämmchen eingetreten. Die Blattbasis beginnt zu plasmoly- sieren	Keine Plasmolyse. Das Blätt- chen ist etwas höher inseriert. Noch keine Plasmolyse an der Blattbasis
13'	Bis 20 Reihen vom Schnittrand und 12 Reihen von der Blatt- basis schwach konkave Plas- molyse	Keine Plasmolyse
15'	Etwa ein Drittel des Blätt- chens vom Schnittrand und ein Drittel von der Basis her plas- molyse. Plasmolysegrade nehmen gegen die Mitte ab.	An der Blattspitze einige schwache Plasmaabhebungen
18'	Unverändert	Etwa 5% der Blattfläche von der Blattspitze her plasmoly- siert
25'	Alle Zellen schwach plasmoly- siert	Zunahme der plasmolysierten Zellen an der Blattspitze und Beginn von Plasmolyse an der Blattbasis

Ergebnis: Die Seitenmembranen sind für Erythrit schon ziemlich leicht wegsam, die Außenmembranen hingegen noch undurchdringlich. (Diese Versuche wurden im Herbst an dem seit Sommer kultivierten Material gemacht. Es scheint die Dichte

der Membran etwas zugenommen zu haben. Am standortfrischen Material war nämlich auch in den unverletzten Blättchen schon nach 20 Minuten allenthalben schwacher Plasmolysebeginn in Erythrit zu beobachten.)

#### 1,5 Mol Glycerin:

Zeit nach dem Einlegen	Angeschnitten	Unverletzt
15''	In der Nähe des Schnitttrandes und einer toten Stelle konkaver Plasmolysebeginn	Keine Plasmolyse
2'	In der Nähe des Schnitttrandes und einer toten Stelle konkaver Plasmolysebeginn	Keine Plasmolyse
4'	In der Nähe des Schnitttrandes und einer toten Stelle konkaver Plasmolysebeginn. Zunahme der Zahl der Plasmolyse	Keine Plasmolyse in der Blattfläche. Nur in der Umgebung einiger toter Zellen in der Blattspitze Plasmolysebeginn
12'	Alle Zellen konkav plasmolysiert	Von der verletzten Stelle rückwärtend das halbe Blättchen plasmolysiert
1½h	Alles deplasmolysiert	Alles deplasmolysiert

Ergebnis: Die Außenmembran fast nicht, die Seitenwände sehr leicht wegsam für Glycerin.

#### 1,5 Mol Harnstoff:

Zeit nach dem Einlegen	Angeschnitten	Unverletzt
30''	Bis 3 Reihen vom Schnitttrand plasmolysiert	Keine Plasmolyse
1½'	7—10 Reihen vom Schnitttrand plasmolysiert	Keine Plasmolyse
4'	18 Reihen vom Schnitttrand plasmolysiert	Keine Plasmolyse
6'	Alle Zellen plasmolysiert	In der Spitze und von der Basis her Plasmolysebeginn
20'	Alle Zellen plasmolysiert	Eine Längshälfte fast ganz, die andere zum Teil plasmolysiert
34'	Alle Zellen plasmolysiert	Alle Zellen konkav plasmolysiert
53'	Keine merkbare Deplasmolyse	Ebenso wie angeschnitten
2h	Etwas schwächere Plasmolyse	Ebenso wie angeschnitten
4h45'	Teils deplasmolysiert, teils noch ganz schwache Abhebungen	Ebenso wie angeschnitten

Ergebnis: Die Außenmembran noch immer fast undurchdringlich für das Plasmolytikum, die seitlichen Wände dagegen sehr leicht durchlässig (deutlich leichter als für Erythrit!).

## 1,0 Mol Formamid:

Zeit nach dem Einlegen	Angeschnitten	Unverletzt
10"	Keine Plasmolyse	Keine Plasmolyse
30"	Keine Plasmolyse	Keine Plasmolyse
60"	Keine Plasmolyse	Keine Plasmolyse

## 1,5 Mol Formamid:

Zeit nach dem Einlegen	Angeschnitten	Unverletzt
10"	Konkaver Plasmolyseeintritt am Schnitttrand	Keine Plasmolyse
20"	Konkaver Plasmolyseeintritt am Schnitttrand	Keine Plasmolyse
50"	Die äußersten 2 Reihen deplasmolysiert, 3 weitere Reihen konvex	Keine Plasmolyse
1'50"	Kein Weiterschreiten der Plasmolysen. Schon fast deplasmolysiert	Keine Plasmolyse
2'	Alles deplasmolysiert	Keine Plasmolyse

## 3,0 Mol Formamid:

Zeit nach dem Einlegen	Angeschnitten	Unverletzt
10"	Bis 3 Reihen vom Schnitttrand konkaver Plasmolyseeintritt	Keine Plasmolyse
60"	Reihe am Schnitttrand deplasmolysiert, 7 weitere Reihen plasmolysiert	Keine Plasmolyse
3'	Noch vereinzelte konvexe Plasmolysen	Keine Plasmolyse
4'	Alles deplasmolysiert	Keine Plasmolyse

Ergebnis: 1,0 Mol Formamid dringt so schnell durch das Plasma, daß weder bei Eintritt durch die Außen- noch durch die Seitenmembranen Plasmolyse zustande kommen kann. 1,5 und 3,0 Mol ruft am Schnitttrand der verletzten Blättchen sofort Plasmolyse hervor. In den äußersten Zellreihen tritt aber schon Deplasmolyse ein, während die nach innen anschließenden Zellreihen noch Plasmolysen zeigen. Aber auch diese gehen nicht über die 7. Zellreihe vom Schnitttrand hinaus (bei 3,0 Mol). Dann ist der Durchtritt durch die Membranen schon so verlangsamt, daß die gleichzeitige Permeation des Formamids in die Vakuole keine Plasmaabhebung mehr eintreten läßt. Die dichte Außenmembran verhindert oder verzögert den Durchtritt des Formamids so sehr, daß überhaupt keine Plasmolysen auftreten.

Stellen wir *Mnium rostratum* und *Mn. serratum* noch einmal gegenüber, so hat *Mnium rostratum* eine so weitmaschige äußere Zellwand, daß nicht nur die großmolekulare Raffinose kaum gehemmt (Plasmolyseeintritt nach etwa 1½ Minuten) einzudringen vermag, sondern auch das kleinmole-

kulare Formamid so leicht hindurchtritt, daß diese überaus schnell durch das Plasma permeierende Substanz doch in allen Zellen vorher noch vorübergehende Plasmolysen hervorzurufen vermag. Unterschiede zwischen Außen- und Seitenmembranen sind nicht festzustellen. Bei *Mn. serratum* können wir jedoch deutlich Verschiedenheiten in der Wegsamkeit der äußeren und der seitlichen Zellwand erkennen. Traubenzucker dringt wohl noch durch die Außen- und Seitenmembran ungefähr gleich schwer ein. Erythrit zeigt die ersten deutlichen Unterschiede. Die Außenmembran ist noch kaum wegsam dafür, die innere leicht. In Glyzerin und Harnstoff sehen wir sehr raschen Eintritt durch die Seitenwände und noch immer stark gehemmten durch die Außenmembran. Selbst das kleinmolekulare Formamid wird, sofern es die Außenwände der Zellen überhaupt zu durchdringen vermag, in seinem Eintritt so verlangsamt, daß bei der großen Plasmapermeabilität dieses Stoffes das Zustandekommen einer Plasmolyse verhindert wird. Vom Schnitttrand durch die Seitenmembranen in die Zelle eindringendes Formamid ruft demgegenüber in den wundrandnahen Zellschichten kurz andauernde, schnell wieder zurückgehende Plasmaabhebungen hervor.

*Mnium punctatum* reiht sich zwischen diese beiden extremen Typen ein. Für die Durchlässigkeit der äußeren Zellwand ergibt sich folgendes Bild (+ = Plasmolyse):

Mol. Vol.	Raffinose 498,8	Rohrzucker 345,6	Traubenzucker 183,3	Erythrit 130,2	Harnstoff 59,2	Formamid 46,7
<i>Mn. punct.</i>	—	—	+	+	+	—

In Rohrzucker traten erst nach  $\frac{1}{2}$  Stunde oder später beiderseits der Mittelrippe vereinzelte Plasmolysen auf, die sich innerhalb von 20 Stunden auf einen Großteil der Blattfläche ausbreiteten. Der Eintrittsweg für den Rohrzucker war somit klar das abgeschnittene Sproßende und nicht die Außenmembran der Blattzellen. Nur in der Umgebung von verletzten Zellen traten schon früher in der Blattfläche Plasmolysen auf, und dies sogar in Raffinose. Der Undurchlässigkeit der äußeren Zellwände steht demnach eine schwache Wegsamkeit der seitlichen Membranen für diese großmolekularen Zucker gegenüber. Der Plasmolyseeintritt in Traubenzucker und Erythrit erfolgt bei den unverletzten Blättchen zwar auch sehr verzögert (etwa nach 10–20 Minuten), aber immerhin ziemlich gleichmäßig über die Blattfläche verteilt, so daß hier ein allmählicher Durchtritt durch die äußeren Zellwände anzunehmen ist.

Mit 1,0 Mol Formamid konnte bei *Mnium punctatum* keine Plasmolyse erzielt werden. Auch angeschnittene Blättchen zeigten keine Plasmolyse. Der Formamideintritt war, wie bei *Mnium serratum*, ebenso schnell wie der Wasserentzug. Erst in 2,0 Mol Formamid kam es schon nach 30 Sekunden in allen Zellen zu bikonvexen Plasmaabhebungen, die nach 2 Minuten wieder fast vollständig zurückgingen. In 1,0 Mol Traubenzucker übertragen, trat in beiden Fällen binnen kurzem neuerlich Plasmolyse ein.



Bei *Mnium punctatum* wurde auch der Plasmolyseeintritt in 1,0 Mol Harnstoff in angeschnittenen und unverletzten Blättchen verglichen:

Zeit nach dem Einlegen	Angeschnitten	Unverletzt
1'	In den meisten Zellen Plasmolysebeginn	Keine Plasmolyse
1½'	Die Plasmolysegrade werden stärker	Erstes Auftreten von Plasmolysen in der Blattfläche
3'	Alles plasmolysiert	In den meisten Zellen schwache Plasmolyse

Der Versuch zeigt wieder die etwas dichtere Beschaffenheit der äußeren Zellwand.

### Zellwandpermeabilität einiger anderer Laub- und Lebermoose

#### Laubmoose

Drei weitere Laubmoose, *Rhodobryum roseum*, *Bryum pseudotriquetrum* und *Hookeria lucens*, zeigten untereinander gleichfalls recht verschiedene Membranpermeabilität.

*Rhodobryum roseum* erwies sich in 1,0 Mol Rohrzucker innerhalb von 20 Minuten als unplasmolisierbar. In 1,0 Mol Traubenzucker war nach dieser Zeit an einem abgetrennten Blatt von der verletzten Basis aufsteigend etwa ein Drittel der Blattfläche plasmolysiert, während in 1,0 Mol Erythrit schon nach 12 Minuten sämtliche Zellen schöne Plasmolysen aufwiesen.

*Bryum pseudotriquetrum* war gleichfalls in Rohrzucker unplasmolisierbar. Erst etwa nach einer halben Stunde kam es beiderseits der Mittelrippe vereinzelt zu Plasmolysen, die sich im Verlauf mehrerer Stunden über fast die ganze Blattfläche ausbreiteten. Der Rohrzucker war dabei aber nicht durch die Außenmembranen, sondern durch den abgeschnittenen Sproß auf dem Weg über die Blattrippe eingetreten. Die seitlichen Membranen sind demnach für diesen großmolekularen Zucker gerade noch wegsam. Auch in Traubenzucker und Erythrit kam es in unverletzten Blättchen erst sehr langsam (nach 10–20 Minuten) zum Eintritt von Plasmolysen, doch scheinen hier die Plasmolytika schon langsam durch die äußeren Zellwände einzudringen. Erst Harnstoff bewirkte schnelleren Plasmolysebeginn in allen Zellen, und 1,0 Formamid vermochte so leicht durch die Membran zu treten, daß schon nach 15 Sekunden in fast allen Zellen Plasmaabhebungen begannen, die nach 1 Minute zu einseitig konvexen Plasmolysen führten, die nach 2 Minuten zurückzugehen anfangen und nach 4 Minuten verschwunden waren.

*Hookeria lucens* besitzt demgegenüber eine etwas weniger dichte äußere Zellwand. Standortfrische, unverletzte Blättchen zeigen in 1,0 Mol Rohrzucker nach 3 Minuten zwar auch nur in einigen blattrandnahen Zellen

und in Blattrandzellen konkaven Plasmolysebeginn, und auch nach 15 Minuten plasmolysieren erst höchstens 3—4% aller Zellen. Die unplasmolysierten Zellen zeigen, besonders in der Blattfläche, häufig typische Cytorrhysen. In 1,0 Mol Traubenzucker finden sich aber schon nach 1 Minute in den Blattrandzellen schwache Plasmaabhebungen, und nach 5 Minuten beginnt Plasmolyse in etwa 80% der Blattfläche einzutreten. In 1,0 Erythrit zeigen nach 2 Minuten — besonders in den jüngeren Blättchen — fast alle Zellen beginnende Plasmolyse, und in 1,0 Harnstoff tritt schon nach 1 Minute in allen Zellen Plasmolyse ein.

Ein Polster der Versuchs-*Hookeria* wurde Anfang September nach Wien gebracht und in einer Glasschale an einem Nordfenster des Instituts kultiviert. Bis November hatten fast alle der am Standort abgeflacht gebauten Sprosse kleine aufrechtstehende, allseits abstehend beblätterte Zuwachssprosse gebildet. Blättchen der alten, noch abgeflachten Moosstämmchen zeigten völlige Übereinstimmung mit den Sommerbeobachtungen. Unverletzte Blättchen derselben zeigen in 1,0 Mol Rohrzucker nach  $\frac{1}{2}$  Minute vielfach Auftreten von Cytorrhysen mit aneinandergepreßten tangentialen Membranen, die die Plastiden schwimmgürtelartig an den Zellrand drängen. Nach 4 Minuten beginnt von der Basis, infolge Eindringens der Lösung durch das kurz abgeschnittene Stammstückchen, Plasmolyse aufzusteigen. Aber auch nach 13 Minuten zeigt die apikale Blatthälfte durchwegs Cytorrhysen. Durch die Außenmembran vermochte also der Rohrzucker nicht einzudringen. Ein am gleichen Sproßstück sitzendes zweites Blättchen war angeschnitten worden. Hier trat am Schnittrand schon nach  $\frac{1}{2}$  Minute Plasmolyse auf, die sich innerhalb von 6 Minuten ziemlich weit über die Blattfläche ausbreitete. Die seitlichen Membranen sind also für Rohrzucker schon etwas besser wegsam.

In 1,0 Mol Traubenzucker begannen in dem unverletzten und in dem verletzten Blättchen nach 1 Minute ziemlich gleichmäßig über die ganze Blattfläche hin Plasmolysen aufzutreten. Nach 3 Minuten hatten in beiden Blättchen fast alle Zellen zu plasmolysieren begonnen, in 1,0 Mol Erythrit traten auch in den unverletzten Blättchen bereits nach  $\frac{1}{2}$  Minute in fast allen Zellen Plasmaabhebungen auf. Im wesentlichen also das gleiche wie im Sommer: die dichtere Außenmembran erlaubt dem Traubenzucker noch ziemlich leicht Durchtritt, bietet aber für den Rohrzucker ein kaum mehr überwindbares Hindernis.

Deutlich davon unterschieden war das Verhalten der Blättchen der aufrechtstehenden Zuwachssprosse. Unverletzte Blättchen dieser zeigten in der Blattfläche innerhalb von 5 Minuten weder in Rohrzucker noch in Traubenzucker und Erythrit Plasmaabhebungen. Nur durch Lösungseintritt vom abgeschnittenen Sproß her begannen an der Blattbasis einzelne Zellen zu plasmolysieren. 1,0 Mol Harnstoff hingegen rief schon innerhalb 1 Minute in allen Zellen Plasmolyse hervor.

Die Membranen der jungen, allseits gleichmäßig ausgebildeten Zuwachssprosse von *Hookeria lucens* sind somit wesentlich dichter gefügt als die der alten abgeflachten Sprosse. Daß hier das Alter allein nicht ausschlag-

gebend sein kann, geht daraus hervor, daß auch die jüngsten Blättchen der standortfrischen, abgeflachten Sprosse die gleichen Durchlässigkeitseigenschaften der Zellwände zeigten wie die nunmehr 3 Monate lang in Kultur gehaltenen, unverändert gebliebenen Flachsprosse.

Es wäre dankbar, nach solch unterschiedlichem Verhalten der Zellwandpermeabilität bei verschiedenen Wuchsformen und Altersstadien auch noch bei anderen Moosen zu suchen.

#### Lebermoose

Nach den bisherigen Erfahrungen ist bei Laubmoosen die Undurchlässigkeit oder schwere Durchlässigkeit ihrer äußeren Zellwände für Rohrzucker und oft auch schon für Traubenzucker die Regel. Cytorrhysen sind besonders in Rohrzucker häufig zu beobachten. *Mnium rostratum* mit seiner für Rohrzucker und sogar für Raffinose leicht wegsamen äußeren Zellwand erscheint als besonderer Ausnahmefall.

Es ist daher bemerkenswert, daß von sieben untersuchten Lebermoosen vier in 1,0 Mol Rohrzucker leicht plasmolysierbar sind: Es sind dies *Metzgeria conjugata*, *Trichocolea tomentella*, *Aplozia riparia* und *Lepidozia reptans*. Einlegen der Blättchen in 0,7 Mol Raffinose erlaubt noch weitere Unterscheidung der Membranweite nach oben zu. In *Metzgeria* treten — schneller noch als bei *Mnium rostratum* — schon nach 15 Sekunden beinahe schlagartig in fast allen Zellen Plasmolysen auf. Nach 2 Minuten sind die Plasmolysen bereits in den meisten Zellen einseitig konvex oder bikonvex. *Trichocolea*, *Aplozia* und *Lepidozia* zeigen hingegen in Raffinose erst nach 5—7 Minuten in einzelnen Zellen schwache Plasmaabhebungen.

Die größere Membrandichte von *Trichocolea* ist auch schon in 1,0 Mol Rohrzucker daran zu erkennen, daß etwa 15 Sekunden nach dem Einlegen infolge raschen Wasserentzuges und nur langsamen Eindringens der Zuckerlösung durch die Membran an vielen Zellen ein leichtes „Zerknittern“ zu beobachten ist. Nach 2—3 Minuten glätten sich die Knitterstellen wieder und die ersten Plasmolysen werden sichtbar. Nach 5 Minuten sind alle Zellen plasmolysiert.

Drei weitere Lebermoose, *Plagiochila asplenioides*, *Bazzania trilobata* und *Calypogeia Neesiana*, zeigen eine geringere Zellwandpermeabilität. Mit 0,7 Mol Raffinose ist überhaupt keine Plasmolyse zu erreichen, und auch in 1,0 Mol Rohrzucker kommt es nur in einem Teil der Zellen zu schwachen Plasmaabhebungen. In 1,0 Mol Traubenzucker plasmolysieren aber auch diese Moose mehr oder weniger leicht. Es darf nicht verschwiegen werden, daß gleiche Moose von verschiedenen Standorten bzw. vielleicht auch verschiedenen Entwicklungsstadien kleine Abweichungen zeigen können. So ließ sich z. B. die *Plagiochila asplenioides* eines anderen Standortes in Rohrzucker wesentlich rascher plasmolysieren. Die allgemeine Plasmolysierbarkeit der Lebermoose in Traubenzucker geht auch aus der umfangreichen Studie von Will-Richter (1949) über den osmotischen Wert der Lebermoose hervor, die ihre sämtlichen Versuchsmoose mit Erfolg in Traubenzucker plasmolysierte. Die von der Autorin gefundenen Sommerwerte stimmen auch mit den von mir beobachteten, verhältnismäßig niederen Werten

gut überein. Erst im Winter steigt der osmotische Wert bei vielen Lebermoosen (z. B. bei *Plagiochila* und *Lepidozia*) über 1,0 Mol Traubenzucker an.

### Einige Beobachtungen über Harnstoffpermeabilität von Lebermoosen

Pecksieder (1945, 1947) hat in ihren Permeabilitätsstudien an Lebermoosen unter 27 geprüften Arten bei im allgemeinen niederer Harnstoffpermeabilität nur eine Art, nämlich *Chiloscyphus rivularis*, gefunden, die sich durch eine rapide Harnstoffpermeabilität auszeichnete. Höfler (1945) hat ein gleiches Verhalten an *Chiloscyphus pallescens* nachgewiesen.

Im Verlauf meiner auf die Membrandurchlässigkeit ausgerichteten Versuche mit Harnstoff konnte ich noch drei weitere Lebermoose mit überaus schneller Harnstoffpermeabilität auffinden:

1. *Metzgeria conjugata*. Es sei nur ein Versuch für viele geschildert: Es war aufgefallen, daß sich trotz Grenzplasmolyse in 0,5 Mol KCl und leichter Plasmolysierbarkeit in den verschiedenen Zuckern in 1,0 Harnstoff kaum eine einzige Plasmolyse erzielen ließ. Das ließ schon vermuten, daß der Harnstoff ebenso schnell in die Zellen eindringt, als diesen das Wasser entzogen wird. In 1,5 Mol Harnstoff traten auch tatsächlich binnen wenigen Sekunden in allen Zellen Plasmolyse ein. Sie begann aber schon nach 2 Minuten deutlich zurückzugehen, und nach 5–4 Minuten waren die Zellen deplasmolysiert. Wurde das gleiche Moosästchen anschließend in 1,0 Mol Rohrzucker gelegt, so begann sich schon nach  $\frac{1}{2}$  Minute in vielen Zellen das Plasma wieder abzuheben, und nach  $2\frac{1}{2}$  Minuten zeigten sämtliche Zellen stark konkave Plasmolysen. Diese konkaven Plasmolysen blieben in der Zuckerlösung durch 30 Minuten unverändert erhalten. Wurde darauf Wasser zugesetzt, so rundeten sich die Protoplasten rasch und deplasmolysierten. Neuerliches Durchsaugen von 1,0 Mol Rohrzucker rief binnen 2 Minuten wieder in allen Zellen starke Konkavplasmolysen hervor. Das gleiche Mooszweiglein wurde nun im plasmolysierten Zustand noch einmal in 1,5 Mol Harnstoff übertragen, und es wiederholte sich jetzt das gleiche wie bei der Rückübertragung in Wasser. Nach 1 Minute sind bereits alle Plasmolysen flach oder einseitig bis bikonvex. Nach 2 Minuten geht die Plasmolyse deutlich zurück, nach 3 Minuten sind die ersten Zellen und nach 5 Minuten alle Zellen deplasmolysiert. Daraufhin wurde das Mooszweiglein noch ein letztes Mal in 1,0 Mol Rohrzucker eingelegt, und wieder trat in fast allen Zellen konkave Plasmolyse ein. Damit erscheint die überaus große und vollkommen vitale Harnstoffpermeabilität erwiesen.

Ein Wort verdienen noch die Plasmolyseformen bei diesem Versuch: Wird frische *Metzgeria* direkt in 1,0 Mol Rohrzucker oder direkt in 1,5 Mol Harnstoff eingelegt, so tritt in beiden Fällen sofort ideale bikonvexe Plasmolyse ein. Plasmolysiert man aber, wie in unserem Versuch, zuerst in 1,5 Harnstoff (bikonvex!) und nach erfolgter Deplasmolyse in Rohrzucker, so tritt, wie oben beschrieben, stets konkave Plasmolyse ein, die in der Beobachtungszeit von 30 Minuten unverändert erhalten bleibt. Gleiches zeigte sich auch in allen Versuchen, in denen zuerst mit Rohrzucker plas-

molysiert (bikonvex!), dann in 1,5 Harnstoff deplasmolysiert und daraufhin noch einmal in Rohrzucker plasmolysiert wurde. Auch in diesem Fall ist jetzt die Plasmolyseform in Rohrzucker konkav. Es hat also die Viskosität oder das Haftvermögen zugenommen.

2. *Trichocolea tomentella*. Dieses Moos zeigte gleichfalls Grenzplasmolyse in 0,5 Mol KCl und raschen bikonvexen Plasmolyseeintritt in 1,0 Rohrzucker (meist geteilte Protoplaste). In 1,0 Mol Harnstoff traten zwar auch schon nach  $\frac{1}{2}$  Minute Plasmolysen auf, die Plasmolysegrade blieben aber sehr gering und ein Teil der Plasmolysen ging in den nächsten Minuten wieder zurück. Zweigeteilte Protoplaste, wie in Rohrzucker, waren nie zu beobachten. In 1,5 Mol Harnstoff ließen sich stärkere Plasmolysegrade erzielen, die wohl etwas zurückgingen, aber doch nicht so schnell zu einer völligen Deplasmolyse führten. Die Harnstoffpermeabilität scheint demnach auch hier ziemlich groß, wenn auch nicht so groß wie bei *Metzgeria* zu sein.

3. *Lepidozia reptans*. Dieses Lebermoos, das gleichfalls in 1,0 Mol Rohrzucker schnell und stark plasmolysiert, zeigte in 1,0 Mol Harnstoff nur in den jüngeren Blättchen schwachen Plasmolyseeintritt, der in wenigen Minuten wieder vollständig zurückging. In 1,5 Mol Harnstoff trat jedoch nach 1 Minute in allen Zellen bikonvexe Plasmolyse ein. Nach 2 Minuten war ein Plasmolyserückgang schon unverkennbar, nach  $3\frac{1}{2}$  Minuten waren einige Seitenzweiglein bereits vollständig deplasmolysiert, nach 4 Minuten war auch in etwa 40% der Zellen des Hauptsprosses die Plasmolyse zurückgegangen und nach 6 Minuten waren alle Zellen deplasmolysiert. Nachfolgendes Einlegen in 1,0 Mol Rohrzucker ließ nach 2 Minuten wiederum in allen Zellen Plasmolyse eintreten. Hier war — im Gegensatz zu *Metzgeria* — auch die nach Harnstoffdeplasmolyse erfolgende Rohrzuckerplasmolyse durchwegs einseitig konvex oder bikonvex. Das Stämmchen wurde nun auch in diesem Versuch wieder aus dem Rohrzucker in 1,5 Mol Harnstoff übertragen. Nach 2 Minuten waren bereits etwa 60% und nach 4 Minuten alle Zellen deplasmolysiert. Auch diesem Moos kommt somit außerordentlich rasche, vitale Harnstoffpermeabilität zu.

Daß die drei genannten Moose auch die größte Zellwandpermeabilität unter den Lebermoosen besitzen und noch dem Rohrzucker, *Metzgeria* sogar auch noch der Raffinose, leichten Durchtritt gewähren, ist wohl nur ein zufälliges Zusammentreffen. *Mnium rostratum* mit seiner gleichfalls sehr locker gebauten Membran zeigt nämlich keinerlei erhöhte Harnstoffpermeabilität. Bei ihm bleiben die in 1,0 Mol Harnstoff auftretenden, stark bikonvexen Plasmolysen in einer Beobachtungszeit von 2 Stunden unverändert erhalten.

### Besprechung der Versuche

Die Mitteilung ist angeregt worden durch die in neuerer Zeit eingesetzte Diskussion über den Einfluß der Zellwandpermeabilität auf Volumschwankungen des Protoplasten beim Umlegen aus hypertonischen Rohrzuckerlösungen in isotonische Elektrolytlösungen. Daß aus dem Auftreten oder



Nichtauftreten von Plasmolyse in hypertonischen Lösungen verschiedener Teilchengröße auf das Eindringen dieser Lösungen in den Vorraum zwischen Membran und sich abhebenden Protoplasten und damit auf die Porenweite der Zellwände rückgeschlossen werden kann, ist lange bekannt, und die heute schon zahlreich vorliegenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen verschiedener Membranen haben uns diese verschiedene Membrandichte auch schon sichtbar vor Augen geführt (z. B. Frey-Wyssling, Mühlethaler und Wyckoff 1948, Volz 1952). Außer dem verschiedenen dichten, aus ineinander verflochtenen Zellulosemikrofibrillen aufgebauten Mizellargerüst ist aber auch die Einlagerung verschiedener Intermizellarsubstanzen (Lignin, Suberin, Kutin, Pektin, anorganische Stoffe) und der verschiedene Quellungszustand dieser Membrangebilde für die Wegsamkeit der Zellwand für verschiedengroß molekulare Stoffe von Bedeutung.

In unseren Versuchen wurden lediglich frische Moose auf ihre Membranpermeabilität für verschiedene Plasmolytika verglichen, ohne auf die möglichen Ursachen ihres verschiedenartigen Verhaltens einzugehen. Die mitgeteilten Beobachtungen sind daher als Materialsammlung und Anregung aufzufassen, diese Fragen der verschiedenen Membrandichte an diesen oder anderen Objekten weiter zu verfolgen.

Wie sehr sich Arten einer Gattung in ihrer Membranbeschaffenheit unterscheiden können, zeigten die Beobachtungen an den sich in dieser Hinsicht extrem gegenüberstehenden Arten *Mnium rostratum* und *Mnium serratum*. Die Zellwände der ersten sind noch leicht wegsam für Raffinose mit einem Molekularvolumen von 498,8, die der zweiten schon nicht oder kaum durchdringlich für Harnstoff mit einem solchen von 59,2. Beziehen sich diese Angaben auf die äußere Membran, für deren schwere Permeabilität man allenfalls — wenn auch noch nicht nachgewiesen — eine verschiedene Durchsetzung mit Kutin (oder Pektin?) annehmen könnte, so waren besonders die Versuche mit angeschnittenem *Mnium serratum* interessant, die zeigten, daß auch die seitlichen Membranen dieses Mooses bedeutend dichter sind als etwa die von *Mnium rostratum*. Rohr- und Traubenzucker vermochten auch durch die seitlich angeschnittenen Blättchen innerhalb von 30 Minuten nicht einzudringen. Die Grenze war Erythrit mit einem Molekularvolumen von 130,2, das allmählich vom Schnitttrand eindringend in einer Zellreihe nach der anderen Plasmolyse eintreten ließ.

Die auffallend große Dichtigkeit der Außenmembran von *Mnium serratum* wurde durch Plasmolyseversuche mit Formamid (Mol.-Vol. 46,7) noch besonders unterstrichen. Hier blieben unverletzte Blättchen in 1,0, 1,5 und 3,0 Mol Lösung unplasmolysiert. Entweder vermochte selbst dieser kleinemolekulare Stoff nicht durch die Membran einzutreten oder aber die Durchtrittsgeschwindigkeit wurde so herabgesetzt, daß dieser außerordentlich hoch plasmapermeable Stoff durch gleichzeitigen Eintritt in die Vakuole eine Plasmaabhebung verhinderte. In den angeschnittenen Blättchen, wo das Formamid durch die seitlichen Membranen an die Zellen herankam, trat in den schnittrandnahen Zellen Plasmolyse ein, die aber innerhalb von 1–2 Minuten wieder vollständig zurückging.



Zwischen diese beiden Extreme lassen sich die Zellwandpermeabilitäten der übrigen Versuchsmoose einordnen. Das Ergebnis zeigt jedenfalls, daß bei gewissen Permeabilitätsmessungen die Wegsamkeit der Zellwände für die verwendeten Diosmotika in Betracht gezogen werden muß.

### Zusammenfassung

1. Die drei *Mnium*-Arten *Mnium rostratum*, *Mnium punctatum* und *Mnium serratum* unterscheiden sich sehr stark in ihrer Zellwandpermeabilität. Die Außenmembran von *Mnium rostratum* ist leicht durchlässig für Stoffe bis zu einem Molekularvolumen der Raffinose (498,8), die von *Mnium serratum* ist dagegen innerhalb von 30 Minuten undurchdringlich bis herunter zu Harnstoff (59,2) und vielleicht auch noch für Formamid (46,7).

2. Es unterscheiden sich nicht nur die äußeren, allenfalls verschieden kutinisierten Zellwände durch ihre Dichte, sondern auch die seitlichen, durch Anschneiden freigelegten. So sind die seitlichen Membranen von *Mnium serratum* für Traubenzucker noch undurchdringlich und erst Erythrit (Mol.-Vol. 130,2) dringt allmählich ein. Das sehr schnell durch das Plasma permeierende Formamid läßt nur in den schnittrandnahen Zellreihen der angeschnittenen Blättchen rasch zurückgehende Plasmolyse eintreten.

3. Die Außenmembranen der meisten Laubmoose scheinen für Rohrzucker nicht mehr wegsam zu sein. Traubenzucker ruft hingegen auch in den anderen untersuchten Laubmoosen (*Mnium punctatum*, *Bryum pseudotriquetrum*, *Rhodobryum roseum*) binnen kurzem Plasmolysen hervor. Nur *Hookeria lucens* zeigte auch noch in Rohrzucker in einigen Zellen Plasmolyse.

4. Demgegenüber waren von sieben untersuchten Lebermoosen noch vier (*Metzgeria conjugata*, *Trichocolea tomentella*, *Lepidozia reptans* und *Aplozia riparia*) in Rohrzucker gut plasmolysierbar. Aber nur *Metzgeria* zeigte auch noch für Raffinose eine leicht wegsame Außenmembran. Unverletzte Blättchen von *Plagiodhila asplenioides*, *Bazzania trilobata* und *Calyptogeia Neesiana* ließen sich erst in Traubenzucker plasmolysieren.

5. Ein Vergleich der Membranpermeabilität der Blättchen von abgeflachten standortfrischen und auch 3 Monate kultivierten *Hookeria*-Sprossen und solchen von in der Kultur aus diesen hervorwachsenden aufrechtstehenden Sprossen zeigte deutliche Unterschiede. In unverletzten Blättchen der Flachspresse waren in Rohrzucker nur vereinzelte Zellen plasmolysiert, in Traubenzucker alle. In den aufrechtstehenden Zuwachssprossen war hingegen auch in Traubenzucker keine Plasmolyse zu erzielen, und sogar in Erythrit kam es noch zu keinen Plasmaabhebungen. Erst Harnstoff vermochte so leicht durch die Membran einzutreten, daß innerhalb 1 Minute alle Zellen zu plasmolysieren begannen.

Alters-, entwicklungs- oder standortbedingte Verschiedenheiten der Zellwandpermeabilität wären weiter zu untersuchen.

6. Aus den Befunden ist die Folgerung erlaubt, daß bei bestimmten Permeabilitätsmessungen, z. B. solchen von Volumschwankungen des Proto-

plasten bei Übertragungen in isotonische Lösungen anderer Teilchengröße, die Zellwandpermeabilität nicht außer acht gelassen werden darf.

7. Die Plasmen von *Metzgeria conjugata* und *Lepidozia reptans* erwiesen sich als rapid permeabel für Harnstoff, und auch *Trichocolea tomentella* zeigt hohe Harnstoffpermeabilität.

#### Literatur

- Bennet-Clark, T. A., and D. Bexon, 1946: Water relation of plant cells IV. Diffusion effects observed in plasmolysed tissues. *New Phytologist* **45**, 5.
- Brilliant, B., 1927: Les formes de la plasmolyse produit par des solutions concentrées de sucres et de sels dans les cellules de *Mnium* et de *Catharinea*. *C. r. Acad. Sci. Russ.* **155**—160.
- Casari, K., 1953: Über den Plasmolytikumwechsel-Effekt. *Protoplasma* **42**, 427—447.
- Förster, K., 1955: Quellung und Permeabilität der Zellwände von *Rhizoclonium*. *Planta* **20**, 476—505.
- Frenzel, P., 1929: Über die Porengröße einiger pflanzlicher Zellmembranen. *Planta* **8**, 642—665.
- Frey-Wyssling, Mühlethaler und Wyckoff, 1948: Mikrofibrillenbau der pflanzlichen Zellwände. *Experientia* **4**, 475.
- Härtel, O., 1940: Physiologische Studien an Hymenophyllaceen. 1. Zellphysiologische Untersuchungen. *Protoplasma* **34**, 117—147.
- Herzog, Th., und K. Höfler, 1944: Kalkmoosgesellschaften um Golling. *Hedwigia* **82**, 1—92.
- Höfler, K., 1945: Einige Permeabilitätsversuche an Lebermoosen. *Anzeiger Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl.*, Nr. 3.
- Huber, B., und K. Höfler, 1930: Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. *Jahrb. wiss. Bot.* **73**, 351.
- Jost, 1929: Einige physikalische Eigenschaften des Protoplasmas von *Valonia* und *Chara*. *Protoplasma* **7**, 1—22.
- Kressin, G., 1935: Beiträge zur vergleichenden Protoplasmatik der Mooszellen. *Dissertation Greifswald*.
- Küster, E., 1951: Die Pflanzenzelle, 2. Aufl. Fischer, Jena.
- Mender, G., 1938: Protoplasmatische Anatomie des Laubmooses *Bryum capillare* L. *Protoplasma* **30**, 373—400.
- Pecksieder, E., 1945: Permeabilitätsstudien an Lebermoosen. *Anzeiger Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl.*, Nr. 3.
- 1947: Permeabilitätsstudien an Lebermoosen. *Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I*, **156**, 521—584.
- Renner, O., 1932: Zur Kenntnis des Wasserhaushaltes javanischer Kleinepiphyten. *Planta* **18**, 215—287.
- Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl.
- Volz, G., 1952: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Porengröße pflanzlicher Zellwände. *Mikroskopie* **7**, 251—266.
- Will-Richter, G., 1949: Der osmotische Wert der Lebermoose. *Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I*, **158**, 431—542.

# Über periodische Änderungen im Zustand der Plasmamembran und des Zytoplasmas während des Einzellstadiums des befruchteten Seeigeleies

Von

Georg Kriszat

Wenner-Grens Institut für experimentelle Biologie, Stockholm, Schweden

Mit 7 Textabbildungen

(Eingelangt am 16. März 1954)

Es hat sich gezeigt, daß sowohl die Plasmamembran als auch das Zytoplasma nach der Befruchtung wesentlichen Änderungen in ihrem Zustand unterworfen sind. Darüber hinaus zeigen die vor und während der Teilung auftretenden periodischen Änderungen im Zustand des Plasmas einen Zusammenhang mit den einzelnen Phasen des mitotischen Zyklus. Besonders die erste Mitose ist sowohl bei lebendem als auch bei fixiertem Material mit verschiedenen Methoden untersucht worden. Zur Anwendung kamen u. a. die Dunkelfeld-Beleuchtung [22, 23], das Polarisationsmikroskop [18, 19, 24, 28, 30], der Mikromanipulator [2, 3, 29] und verschiedene Färbemethoden [25]. Ebenso ist auch die Wirkung von erhöhten Temperaturen [20] und von hypertonischem [11, 12, 23] und hypotonischem Seewasser [11, 12, 13, 15, 21] sowie der Einfluß der einzelnen Bestandteile des Seewassers [11, 20] und der bestimmter Chemikalien [11, 20] geprüft worden. Systematische Studien der Protoplasma-Viskosität der Eier von verschiedenen Organismen hat vor allem Heilbrunn mit Hilfe der Zentrifugiermethode ausgeführt (Zusammenfassung siehe [10]). Die Änderungen der physikalischen Eigenschaften des Zellplasmas nach der Befruchtung und während des ersten mitotischen Zyklus sind auf diese Weise registriert worden. Durch das Zentrifugenmikroskop [7] ist es möglich, die sich in der Eizelle während des Zentrifugierens abspielenden Vorgänge direkt zu beobachten. Harvey [5, 6] benutzte diese Methode, um die Einwirkung der Zentrifugalkraft auf unbefruchtete und befruchtete Seeigeleier zu untersuchen. Die Eier wurden in diesem Fall an der Grenzschicht einer Seewasserlösung und einer isotonischen Rohrzuckerlösung suspendiert und zentrifugiert. Bei Anwendung dieser Methode (mit Eiern von *Paracentrotus* und *Parechinus*) zeigten sich Unterschiede in der Rigidität der Plasma-

membran und des Zytoplasmas, zwischen unbefruchteten und befruchteten Eiern [6]. Bei den befruchteten Eiern ergaben sich auch periodische Unterschiede im Zustand der Plasmamembran und des Zytoplasmas, wenn sie nach mechanischer Entfernung der Befruchtungsmembran zu verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung zentrifugiert wurden.

Die Versuche geben jedoch keinen systematischen Überblick über diese Unterschiede während der verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung, in der Art dieser Untersuchung. In der vorliegenden Arbeit wurden Seeigel-eier bei Anwendung einer konstanten Zentrifugalkraft zu verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung zentrifugiert. Da der hohe Widerstand der Befruchtungsmembran eine stärkere Streckung der Eier verhindert, ergaben sich in dieser Hinsicht keine wesentlichen Unterschiede zu verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung. Es erschien darum aussichtsreich, die Eier vor der Befruchtung mit Trypsin [24] zu behandeln, um damit die Bildung einer Befruchtungsmembran zu vermeiden. Auf diese Weise ist es möglich, die durch keine mechanischen Hindernisse beeengte Streckung der zentrifugierten Eier zu beobachten. Da die kurze Behandlung mit Trypsin keine schädigende Wirkung auf das Ei ausübt, kann man so leicht die periodischen Veränderungen der Streckung der Eier im Verlauf der ersten Mitose studieren. Ebenso wurden auch die periodischen Änderungen der Schichtung der Plasmakomponenten nach der Befruchtung mit Hilfe der Zentrifugiermethode verfolgt. Im Zusammenhang mit den oben erwähnten Versuchen ist das Verhalten der Eier in hypertonen Lösungen untersucht worden, um die dabei sichtbaren Veränderungen der Oberfläche, die in Form einer Plasmolyse auftreten, zu vergleichen. Weiterhin wurden die befruchteten Eier zu verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung mit Saponin oder Taurocholat behandelt, um die Einwirkung auf die Lipide oder Proteine der Plasmamembran im Zusammenhang mit der Zytolyse zu studieren.

### Material und Methode

Die Versuche erfolgten während des Sommers an der zoologischen Station Kristineberg an der schwedischen Westküste. Für alle Versuche wurden Eier der litoralen Form von *Psammechinus miliaris* benutzt. Die Eier wurden in einem Seewasser von 25‰ unter konstanten Temperaturbedingungen gehalten. Die erste Teilung der Eier erfolgt bei einer Temperatur von 20 bis 22 Grad zwischen 50 und 60 Minuten nach der Befruchtung. Durchschnittlich kann unter diesen Bedingungen eine Zeit von etwa 55 Minuten angenommen werden.

Zur Untersuchung der verschiedenen Zustände der Eier kamen die folgenden Methoden zur Anwendung:

1. Die Vitellinschicht der Eier wurde vor der Befruchtung durch Behandlung mit 0,005% Trypsin (krist. Trypsin der Firma Armour) entfernt. Nach der Befruchtung wurden die Eier in gleichmäßigen Zeitabständen während des Ein-Zellstadiums zentrifugiert. Das Zentrifugieren erfolgte zwischen Seewasser und einer isotonischen Rohrzuckerlösung für die Dauer von 7 Minuten in einem Zentrifugen-

Mikroskop der Firma Struers, Kopenhagen. Für alle Versuche kam eine konstante Zentrifugalkraft von 4350 G zur Anwendung. Während des Zentrifugierens wurde die Streckung der Eier mit einem Meßokular festgestellt (über diese Methode siehe auch [14]). Zum Vergleich wurden sowohl unbehandelte als auch trypsinbehandelte unbefruchtete und befruchtete Eier zentrifugiert. Die Zentrifugierversuche wurden bei einer Temperatur von 17 bis 18 Grad durchgeführt. Die obenerwähnte Trypsinbehandlung hatte keinen Einfluß auf den normalen Zustand des Zytoplasmas und die weitere Entwicklung der Eier. Die in der Tabelle 1, Spalte 1 wiedergegebenen Werte sind auf den Normaldurchmesser des unbefruchteten Eies bezogen. Sie drücken die Abweichung davon in Prozenten aus. Bei den in Spalte 1 wiedergegebenen Werten handelt es sich um die Streckung, welche die zentrifugierten Eier nach 7 Minuten im Zentrifugenmikroskop zeigten. Während des Zentrifugierens befanden sich durchschnittlich 10–15 Eier im Beobachtungsfeld. Von diesen wurde die Streckung gemessen und davon der Mittelwert für jeden einzelnen Versuch berechnet. Die dargestellten Werte geben den höchsten und niedrigsten Wert aus jeweils 3–4 Versuchen für die angegebenen Zeitpunkte nach der Befruchtung wieder.

2. Das gleiche Material wurde in normalem Seewasser mit einem Zusatz von 2% Dextran in einer gewöhnlichen Zentrifuge bei Anwendung einer konstanten Zentrifugalkraft von 4460 G für die Dauer von 10 Minuten zentrifugiert. Dabei wurde die jeweils auftretende Schichtung der Plasmakomponenten zu verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung bestimmt (siehe Tabelle 1, Spalte 2). Beim Zentrifugieren unbefruchteter Eier von *Psammethinus* zeigt sich nach einiger Zeit eine deutliche Abscheidung des Dottermaterials, das sich in Richtung auf die zentripetale Hälfte hin ansammelt. Zwischen dieser Schicht und den in der zentrifugalen Richtung abgeschiedenen Komponenten erscheint eine breite, durchscheinende hyaline Zone, welche die auf der zentripetalen und zentrifugalen Seite abgeschiedenen Komponenten voneinander trennt. Bei Anwendung einer Zentrifugalkraft von 4350 G ist das nach etwa 5–6 Minuten der Fall. Dieses Niveau ist als 100%ige Schichtung bezeichnet worden, da unter den beschriebenen Bedingungen keine weitere Veränderung mehr eintritt. Die in den befruchteten Eiern auf diese Art bestimmte niedrigste Rigidität des Zytoplasmas entspricht annähernd dem Zustand, der im unbefruchteten Ei vorliegt. Dagegen zeigen die Eier zu bestimmten Zeiten des mitotischen Zyklus eine nur sehr unvollkommene Schichtung. Diese Rigiditätserhöhung des Zytoplasmas kann im Vergleich mit dem oben beschriebenen normalen Schichtungs-niveau des unbefruchteten Eies verglichen und bestimmt werden. Die in der Tabelle 1, Spalte 2, wiedergegebenen Werte sind auf dieses normale Schichtungs-niveau bezogen und drücken die Abweichung davon in Prozenten aus (über Einzelheiten der Methode sowie die hier verwendete Bezeichnung „Rigidität“ siehe auch [27]).

3. Die Eier wurden in verschiedenen Zeitabständen nach der Befruchtung in hypertonische NaCl-Lösung überführt (0,6 Ml. einer 2,5 N NaCl-Lösung + 2 Ml. Seewasser), um die dabei auftretende Form der Plasmolyse festzustellen (siehe Tabelle 1, Spalte 3).

4. Um die Unterschiede in der Zytolyse zu studieren, wurden die Eier in gleichen Zeitabständen in 0,2%ige Lösungen von Saponin oder in 0,1%ige Taurocholatlösungen übertragen. Die Anzahl der zytolysierten Eier wurde in gleichem Zeitabstand (20 Minuten nach der Übertragung) ausgewertet. Bei den in der Tabelle 1, Spalte 4 und 5, angegebenen Zahlen handelt es sich um die höchsten und niedrigsten Werte aus je 2–3 Versuchen für jeden Zeitpunkt.

## Ergebnisse

Beim Zentrifugieren von Eiern, die vor der Befruchtung mit Trypsin behandelt wurden, zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Streckung in verschiedenen Perioden nach der Befruchtung. Tabelle 1 gibt in Spalte 1 eine Übersicht der Werte, die zu verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung gefunden wurden. Die Streckung der mit Trypsin behandelten unbefruchteten

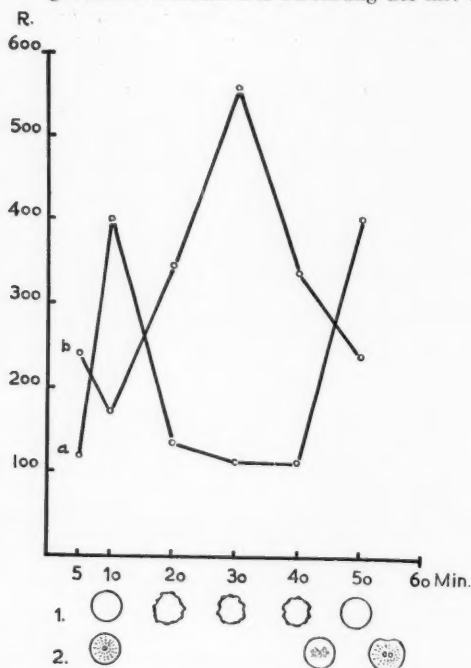


Abb. 1. Reziproke Werte (R) der inneren Schichtung der Eier zu verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung (Kurve a) und der prozentuellen Verlängerung der trypsinbehandelten Eier (Kurve b). 1. Verhalten der Eier im hypertonen Lösungen. 2. Zustände während des mitotischen Zyklus.

ner Zeiten nach der Befruchtung durch Zentrifugieren mit Dextran untersucht wurde, ergaben sich deutliche Unterschiede in der Rigidität (siehe Tabelle 1, Spalte 2). In diesem Fall zeigte sich in der Periode von etwa 10 Minuten nach der Befruchtung eine hohe Rigidität des Zytoplasmas. Die zu diesem Zeitpunkt bestimmte Schichtung der Plasmakomponenten betrug nur 20–30% von der des unbefruchteten Eies. Dagegen gleicht die Schich-

ten Eier ist zum Vergleich mit angeführt. In der Zeit von 5 bis 10 Minuten nach der Befruchtung erfolgt eine starke Verlängerung der Eier. Diese geht dann nach diesem Zeitpunkt zurück und sinkt nach etwa 30 Minuten unter den Wert der mit Trypsin behandelten unbefruchteten Kontroll-eier. Kurz vor der Teilung erfolgt dann ein erneuter Anstieg. Wenn man nicht mit Trypsin behandelte, befruchtete Eier unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, so zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede in der Verlängerung der Eier während der verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung, da der Widerstand der Befruchtungsmembran eine stärkere Streckung der Eier verhindert. Die während dieser Zeit auftretenden geringen Formveränderungen der Eier bieten keine ausreichende Grundlage für eine Aussage über die Rigiditätsänderungen der Plasmamembran während dieser Zeit.

Aus den Versuchen, in denen der Zustand des Zytoplasmas während verschiede-



tung, die in der Zeit von etwa 20 bis 50 Minuten nach der Befruchtung bestimmt werden kann, etwa der des unbefruchteten Eies, wobei der Übergang sich allmählich vollzieht. Die Rigidität des Zytoplasmas ist also während der Zeit der Kernverschmelzung und der Teilung höher als in den übrigen Perioden. Die graphische Darstellung in Abb. 1 gibt eine Zusammenstellung der reziproken Werte ( $R$ ) der prozentuellen Verlängerung der Eier (Abb. 1, Kurve  $b$ ) respektive der inneren Schichtung (Abb. 1, Kurve  $a$ ). Diese reziproken Werte können als ein relatives Maß der Rigidität gelten.

Zur Ergänzung dieser Versuche wurde das gleiche Material zu verschie-

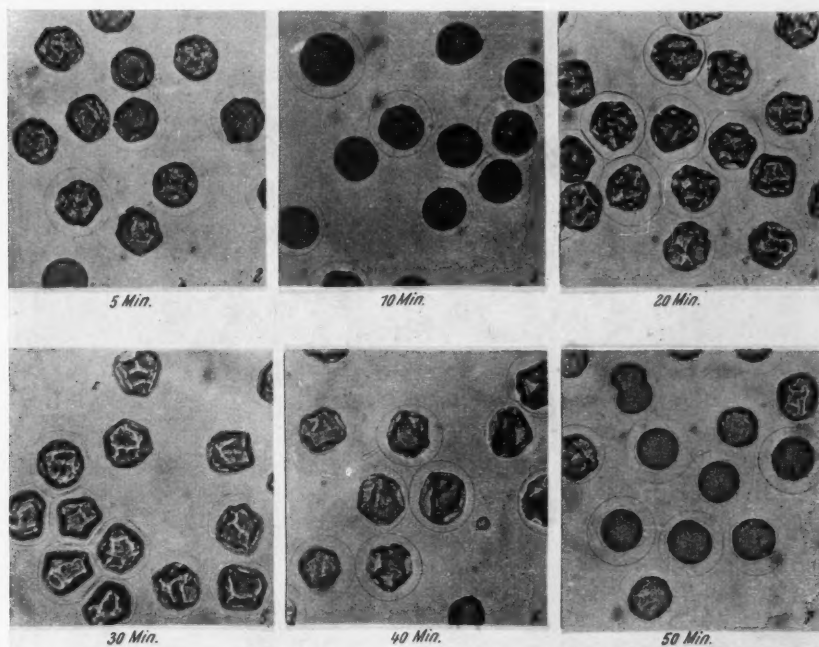


Abb. 2—7. Befruchtete Eier von *Psammehinus miliaris*, die zu verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung in hypertonische NaCl-Lösung übertragen wurden.

denen Zeitpunkten in hypertonische NaCl-Lösung übertragen. Die Abbildungen 2—7 und die Tabelle 1, Spalte 3, zeigen die Ergebnisse dieser Versuche im Hinblick auf das Bild, das die Eier bei der Plasmolyse boten. Die Eier zeigten in der Zeit von 5 bis 10 Minuten und 50 bis 55 Minuten nach der Befruchtung eine runde Form, während sie zu den übrigen Zeiten eine mehr oder minder kantige Plasmolyse aufwiesen. Trypsinvorbehandelte befruchtete Eier zeigten in diesen Versuchen das gleiche Verhalten.

Im Zusammenhang mit den übrigen Versuchen wurden die befruchteten Eier in gleichen Zeitabständen in Seewasserlösungen übertragen, die 0,2%

Saponin oder 0,1% Taurocholat enthielten. In diesem Fall ergaben sich Unterschiede in der Zytolyse während der verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung.

Tabelle 1.

Zeit nach der Befruchtung in Minuten	1.	2.	3.	4.	5.
	Streckung der trypsinbehandelten Eier in Prozenten	Schichtung der Plasmakomponenten in Prozenten	Oberfläche der Eier nach Hypertonie- behandlung	Zytolyse der Eier in Prozenten in 0,2%iger Saponinlösung	Zytolyse d. Eier in Prozenten in 0,1%iger Tau- rocholatlösung
5	200—220	80—90	leicht kantig	60—90	20—30
10	280—300	20—30	rund	50—70	30—50
20	140—150	70—80	kantig	25—35	70—80
30	80—100	80—100	kantig	30—40	80—90
40	120—140	80—100	kantig	60—70	80—90
50	200—220	20—30	rund	70—90	60—70
	unbefruchtete Kontrolle 150—180	unbefruchtete Kontrolle 90—100			

In der Tabelle 1 (Spalte 4 und 5) sind die Ergebnisse dieser Versuche wiedergegeben. Dabei zeigte sich, daß die Zytolyse der Eier in Saponin in der mittleren Periode nach der Befruchtung geringer ist als zu den übrigen Zeiten. Dagegen ergab sich nach der Behandlung mit Taurocholat eine stärkere Zytolyse in der mittleren Periode.

### Besprechung der Ergebnisse

Die Befunde der vorliegenden Versuche haben ergeben, daß in den befruchteten Eiern von *Psammecinus miliaris* während des Ein-Zellstadiums zwei Perioden nachweisbar sind, in denen das Zytoplasma eine hohe Rigidität zeigt. Das ist etwa 10 Minuten nach der Befruchtung und während der Teilung des Eies nach etwa 50—60 Minuten der Fall. Diese Veränderungen im Zustand des Zytoplasmas sind schon von Heilbrunn mit Hilfe der Zentrifugiermethode eingehend studiert worden, der auch eine kritische Übersicht der auf diesem Gebiet unternommenen Versuche gegeben hat [9, 10]. Heilbrunn hat auch eine Kurve veröffentlicht, in der die von ihm bestimmten Viskositätsänderungen des Zytoplasmas der Eier von *Arbacia* im Verlauf der ersten Mitose dargestellt sind [9]. Die Methode der vorliegenden Arbeit erfährt nicht die feineren Unterschiede in der Zytoplasma-rigidität innerhalb kurzer Zeitabschnitte, so wie es in den Versuchen von Heilbrunn geschehen ist. Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen die mit der hier angewandten Zentrifugiermethode erfassbaren, auffälligen

Unterschiede in der Schichtung der Plasmakomponenten in ihrem Zusammenhang mit den Phasen des mitotischen Zyklus.

Es ist von früheren Autoren meist übereinstimmend darauf hingewiesen worden, daß der erste Anstieg der Viskosität des Zytoplasmas im Zusammenhang mit der Ausbildung des „Spermaster“ erfolgt [9]. Der zweite, stärkere Anstieg geschieht mit dem Beginn der Teilung (siehe Abb. 1 unter 2), die sich gleichzeitig in einer Streckung des Eies anzeigt. Während der Teilung ist die hohe Rigidität des Zytoplasmas verhältnismäßig leicht durch Zentrifugerversuche nachweisbar.

Das Verhalten der Plasmamembran nach der Befruchtung ist gleichfalls in zahlreichen Arbeiten mit verschiedenen Methoden untersucht worden (für Zusammenfassung siehe [26]). Ein Teil dieser Arbeiten verfolgt das Verhalten der Pigmentgranula in der Oberfläche des Eies und zieht daraus Schlüsse auf die periodischen Änderungen der Rigidität der Plasmamembran nach der Befruchtung [8, 16, 23].

Brown [1] und Marsland [17] haben das Verhalten der Pigmentgranula in Zentrifugerversuchen unter gleichzeitiger Anwendung von hohem Druck untersucht. Die von ihnen veröffentlichte Kurve über die Rigidität des Kortex während der verschiedenen Perioden nach der Befruchtung ist von Wilson [51] und Heilbrunn [10] kritisch behandelt worden. Sie weisen darauf hin, daß die von Brown und Marsland angegebenen Daten mit Hilfe einer fehlerhaften Meßmethode gewonnen sind und daß die Rigidität des Kortex während der Teilung sinkt und nicht steigt, wie es nach den erwähnten Versuchen der Fall sein soll. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß der Widerstand der trypsinbehandelten Eier gegen die Streckung im Zentrifugerversuch in der mittleren Periode nach der Befruchtung am stärksten war und daß während dieser Periode eine verhältnismäßig niedrige Rigidität des Zytoplasmas festgestellt werden kann. Dagegen zeigen sich in den beiden übrigen Perioden die bereits erwähnten kurzfristigen Zustände mit hoher Zytoplasmarigidität und mehr oder weniger starker Streckung der Eier im Zentrifugerversuch. Das inverse Verhalten der Rigidität in der Eioberfläche und dem Inneren des Zytoplasmas geht sehr klar aus der graphischen Darstellung in Abb. 1 hervor. Gleichzeitig ist in Abb. 1 unter 1 das Verhalten der Eier in hypertonischen Lösungen während der verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung zur Darstellung gebracht. Runnström wies darauf hin [23], daß die Rigidität des Kortex durch einen entsprechenden Plasmolysetyp im Hypertoniever-such reflektiert wird. In den vorliegenden Hypertonieversuchen zeigte sich gleichfalls ein unterschiedliches Verhalten der Eier in bezug auf das Auftreten der kantigen Plasmolyse, wobei die Perioden, in denen sie eine glatte Oberfläche zeigen, den Streckungsperioden im Zentrifugerversuch mit trypsinbehandelten Eiern entsprechen, während die kantige Plasmolyse in der dazwischenliegenden Zeit auftritt. In diesem Zusammenhang sind Versuche von Chambers und Leonard [4] erwähnenswert, die bei den Eiern von *Arbacia* die Befruchtungsmembran und die hyaline Schicht durch Behandlung mit Harnstoff entfernten und die Eier zu verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung einer Hypotoniebehandlung aussetzten. In diesem Fall

zeigten die Eier während des Monaster- und des Amphiasterstadiums eine relativ langsame Schwellung und platzten schnell. Dagegen erfolgte in der Interphase zwischen dem Monaster- und dem Amphiasterstadium eine ziemlich rasche Schwellung, ohne daß die Eier platzten.

Das Verhalten der Eier gegen Saponin und Taurocholat deutet ebenfalls auf Veränderungen in der Zelloberfläche während des mitotischen Zyklus hin. Herlant [11] fand, daß der Widerstand der befruchteten Eier gegen Saponin während der mittleren Periode nach der Befruchtung geringer ist als unmittelbar danach oder kurz vor der Teilung. Die hier erwähnten Befunde stehen nicht in Übereinstimmung mit diesen Resultaten, sondern zeigen eine geringere Zytolyse in der mittleren Periode.

Das Verhalten der befruchteten Eier gegenüber verschiedenen Chemikalien sowie gegen Änderungen des Mediums und der Temperatur ist von früheren Autoren eingehend untersucht worden. Öhmann [20] diskutierte die Ergebnisse dieser Versuche und stellt dabei das Verhalten der Lipoid- und Proteine in der Oberfläche des Eies während des Ein-Zellstadiums in den Vordergrund seiner Betrachtungen. Er unterscheidet während dieser Zeit ein sogenanntes Lipoid- und ein Proteinstadium. In diesem Zusammenhang soll auch der oben erwähnte Befund von Herlant darauf hindeuten, daß der Angriff von Saponin während des sogenannten Lipoidstadiums (10–35 Minuten nach der Befruchtung) des Eies stärker ist als in der Anfangs- (2–10 Minuten) oder Endperiode (40–55 Minuten nach der Befruchtung), die als Proteinstadium bezeichnet wird, weil hier das Verhalten der Eioberfläche mehr von dieser Komponente bestimmt sein soll. Auch die übrigen Veränderungen in der Rigidität des Zytoplasmas und der Oberfläche sowie das Verhalten der Eier gegen Hypo- und Hypertonie, Wärmebehandlung, verschiedene Chemikalien usw. sind von diesem Standpunkt aus diskutiert worden. Die Befunde der vorliegenden Arbeit ermöglichen keine Entscheidung über die Frage, in welcher Weise die hier beobachteten periodischen Veränderungen im Verhalten der Eier durch Änderungen im chemischen Aufbau der Zelloberfläche bedingt sind. Man muß aber damit rechnen, daß periodische Veränderungen der chemischen Bindungskräfte stattfinden. Besonders bezüglich der Zelloberfläche scheint es möglich, daß die Bindungskräfte innerhalb der Lipoproteine einem Wechsel unterworfen sind.

### Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Bei befruchteten Eiern von *Psammehinus miliaris* werden die periodischen Änderungen im Zustand der Plasmamembran und des Zytoplasmas während des Ein-Zellstadiums mit Hilfe von Zentrifugerversuchen untersucht.
2. Die Rigiditätsänderungen der Plasmamembran und des Zytoplasmas nach der Befruchtung und die durch Plasmolyse und Zytolyseversuche ermittelten Befunde werden im Zusammenhang mit dem mitotischen Zyklus besprochen.

Am Ende dieser Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. John Runnström für die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen und seine Hilfe meinen allerherzlichsten Dank auszusprechen. Weiter danke ich Herrn Prof. Nils Holmgren und Herrn Dr. Gunnar Gustafson von der zoologischen Station Kristineberg für ihre freundliche Hilfe und die ständige Beschaffung des für die Untersuchungen benötigten Materials.

#### Literatur

- [1] Brown, D. E. S., 1934: J. cellul. a. comp. Physiol. 5, 335.
- [2] Chambers, R., 1917: J. exper. Zool. 23, 483.
- [3] — 1917: J. gen. Physiol. 2, 49.
- [4] — E. L. Chambers, and L. M. Leonard, 1949: Biol. Bull. 97, 233.
- [5] Harvey, E. B., 1933: Biol. Bull. 65, 389.
- [6] — 1934: Ibid 66, 228.
- [7] Harvey, E. N., and A. L. Loomis, 1930: Science 72, 42.
- [8] Heilbrunn, L. V., 1920: J. exper. Biol. 30.
- [9] — 1927: Quart. Rev. Biol. 11, 220.
- [10] — 1952: An Outline of Gen. Physiol. 3rd. ed., W. B. Saunders Comp.
- [11] Herlant, M., 1920: Arch. Biol. 30, 517.
- [12] Hobson, A. D., 1932: J. exper. Biol. 4, 69.
- [13] Just, E., 1928: Physiol. Zool. 1.
- [14] Kriszat, G., 1954: Exptl. Cell. Res. 7, 1.
- [15] Lillie, R. S., 1916: J. exper. Zool. 21, 369.
- [16] Lindahl, P. E., 1932: Protoplasma 16, 378.
- [17] Marsland, D. A., 1938, 1939: J. cellul. a. comp. Physiol. 12, 57; 13, 15.
- [18] Monné, L., 1945: Ark. Zool., 35 A, No. 13.
- [19] Monroy, A., and G. Montalenti, 1947: Biol. Bull. 92, 151.
- [20] Ohmann, L. A., 1945: Ark. Zool., 36 A, No. 6.
- [21] Page, J., 1928: Brit. J. exper. Zool. 6, 219.
- [22] Runnström, J., 1923: Acta Zool. 4, 285.
- [23] — 1928: Protoplasma 4 und 5, 388, 201, I/II.
- [24] — L. Monné, and L. Broman, 1945: Ark. Zool., 35 A, No. 3.
- [25] — 1949: Advances Enzymol. 9, 241.
- [26] — 1952: Symposia Soc. for Exp. Biology VI.
- [27] — and G. Kriszat, 1950: Exptl. Cell. Res. I, 284.
- [28] Rothschild, Lord, and M. M. Swann, 1949: J. exper. Biol. 26, 164.
- [29] Seifrizz, W., 1920: Bot. Gaz. 70, 360.
- [30] Swann, M. M., 1951: J. exper. Biol. 28, 417.
- [31] Wilson, W. L., 1951: J. cellul. a. comp. Physiol. 38, 409.

# On the Influence of Adenosine Triphosphate (ATP) on the Membrane Formation and the Cytoplasmic State in the Sea Urchin Egg

By

Elsa Wicklund, Stockholm

With 4 Figures

(Received March 27, 1954)

In several papers Runnström and Kriszat describe the influence of adenosine triphosphate (ATP) on the membrane formation and the state of the cytoplasm in sea urchin eggs [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12]. The sea urchin species used in these investigations were *Psammechinus miliaris*, *Echinocardium cordatum* and the winter spawning form, *Strongylocentrotus droebachiensis*. The ATP effect on the cytoplasm of the unfertilized egg was found to be quite conspicuous. The rigidity of the cytoplasm is considerably increased by ATP treatment [4, 11]. The same authors demonstrated that addition of ATP in appropriate concentrations (0.003–0.005 M) improves the membrane formation in eggs of *Strongylocentrotus droebachiensis* which form very defective membranes upon insemination when kept in sea water [4, 12]. It was also stated that the cleavage and the further development of the eggs become more regular in the presence of 0.003–0.01 M ATP [4, 12]. ATP was also found to counteract the effect of certain fertilization inhibitors [2, 3, 4, 7, 8, 12].

In the spring of 1948 the present author carried out experiments at the Zoological Station, Naples, on the influence of ATP on the formation of the fertilization membrane and the cytoplasmic state in unfertilized sea urchin eggs of the species *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*. These experiments were repeated and extended in 1952. The results of these investigations have, however, not been previously published. The aim of the present paper is to describe these experiments on the influence of ATP on the sea urchin egg. These experiments have been further extended by Runnström and Kriszat.

In the experiments performed in 1948 a Ba-salt of ATP kindly prepared by Mr. L. Ernster in this laboratory was used and in 1952, an ATP preparation from Sigma Chemical Co. In all experiments the Ba-salt was



converted to Na-salt before use. It must be stressed that the concentrations of ATP were not well defined in these experiments because of partial breakdown of the substance.

**a) Influence of ATP on the formation of the fertilization membrane in the sea urchin egg**

As pointed out previously [6, 8, 13, 14, 16], the *Arbacia* egg when fertilized sometimes does not form a membrane separated from the egg surface, but instead a tight, gelatinous rim. This gelatinous rim is a continuation of the egg surface and merely represents a step in the process of membrane formation [6, 8, 13, 16]. However, if insemination occurs in the presence of serum albumin [16] or extracts from the granular fraction or the supernatant from homogenized eggs [14, 17] or other substances, an elevated membrane is formed with a membrane space between the egg surface and the membrane. The elevated membrane is harder and tougher than the adhering membrane. Addition of ATP (in the concentrations 0.0001–0.001 M solution of Ernster's preparation) improves membrane formation in the *Arbacia* egg. Higher concentrations of this ATP preparation were less effective in bringing about a normal membrane differentiation. Runnström found earlier [5] that treatment of eggs of *Psammechinus miliaris* with 0.005 M ATP inhibits or delays normal membrane formation. This is probably due to the high ATP concentration. In the experiments carried out in 1952 with an ATP preparation from Sigma Chemical Co. even stronger ATP concentrations (0.005–0.01 M) favoured the formation of a normal, elevated fertilization membrane. *Arbacia* eggs kept in sea water for several hours often lose their capacity of forming normal elevated membranes upon fertilization. If these eggs are transferred to ATP solutions this capacity is revived. Table 1 shows the influence of ATP on membrane formation in eggs that formed gelatinous rims in the control upon fertilization.

Table 1. Influence of ATP (from Sigma Chemical Co.) on the formation of the fertilization membrane in eggs of *Arbacia lixula*. The eggs were pretreated for 30 minutes before insemination.

Medium (2 ml)	Observations 25 minutes after insemination
Sea water (control)	90% fertilization; tight, adhering, gelatinous rims.
0.005 M ATP	100% fertilization; well elevated membranes with a distinct membrane space.
0.001 M ATP	The same result as in bowl 2.

In the experiments reported in Table 1 the eggs were pretreated for 30 minutes in ATP solutions before adding sperm. This pretreatment was, however, not indispensable. At the moment of fertilization the presence of ATP was required in order to improve the membrane formation.

If the eggs are transferred to a hypertonic medium (2 ml sea water + 0.6 ml 2.5 N NaCl solution) the difference between the adhering gelatinous rims of the control eggs and the well elevated membranes of the ATP treated eggs is particularly conspicuous. This is demonstrated in Fig. 1 and 2. Fig. 1 shows a control egg which has assumed an angular form. The membrane did not even separate from the egg surface when this retracted. Fig. 2 shows an ATP treated egg. The separation of the membrane is here very distinct and the angular shape of the egg is more pronounced than in Fig. 1.

Heating of the ATP solution to 100° C. did not reduce its improving effect on the membrane formation.

When insemination occurs in ATP, the percentage of fertilized eggs mostly amounts to 100 or close to 100 even if the value is much lower in the control eggs. The membrane elevation sets in earlier in ATP than in sea water. The further development is also more rapid and regular in ATP than in sea water [4, 12].

As pointed out in a preceding paper [16], ATP stimulates the spermatozoa for a short time ( $\frac{1}{2}$ –1 hour). In contradistinction to other fertilization improvers, i. e. albumin [16] and extracts from the granular

fraction and the supernatant of egg homogenates, ATP does not prolong the period of active life of the spermatozoa.

An extract from the alga *Fucus vesiculosus*—the fertilization inhibitor (Fucus) or FeInh(Fu)—which is rich in polysaccharides, has been shown to block fertilization in all sea urchin species examined [1, 17]. It was further stated that substances promoting fertilization and membrane formation in sea urchin eggs were able to counteract the effect of FeInh(Fu) [17]. Such fertilization improvers are albumin, extracts from the granular fraction, and the supernatant of egg homogenates. Since ATP also acts as fertilization improver, it may counteract the injurious effect of FeInh(Fu). Furthermore Runnström and Kriszat found that dissolved jelly coat substance which also inhibits normal membrane formation is counteracted by addition of ATP in sufficient quantities. These experiments were made on material of *Strongylocentrotus droebachiensis* [12]. The present work reports several experiments carried out in order to determine whether or

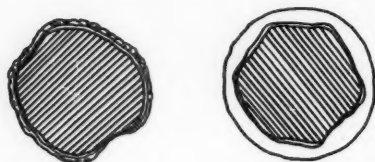


Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 1 and 2. Schematic figures of fertilized *Arbacia* eggs transferred to hypertonic medium (2 ml sea water + 0.6 ml 2.5 N NaCl solution). Fig. 1 shows a control egg and Fig. 2 an egg pretreated with ATP for 30 minutes before insemination. See text.

not ATP destroys the fertilization inhibitory effect as well. A typical experiment of this type is recorded in Table 2.

Table 2. Influence of (1) ATP (from Sigma Chemical Co.), (2) FeInh(Fu)(B6), and (3) of both these substances combined on the fertilization of eggs of *Arbacia lixula*. The eggs were pretreated for 30 minutes prior to insemination.

Medium	Observations 20 minutes after insemination
2 ml sea water (control)	70% fertilization; adhering, gelatinous rims.
2 ml 0.001 M ATP	100% fertilization; well elevated membranes.
1.8 ml 0.05% FeInh(Fu) + 0.2 ml sea water	No fertilization; spermatozoa very motile and aggregated in rings around the eggs.
1.8 ml 0.05% FeInh(Fu) + 0.2 ml 0.1 M ATP	No fertilization; spermatozoa very motile and aggregated in rings around the eggs.
1.8 ml 0.05% FeInh(Fu) + 0.2 ml 0.01 M ATP	No fertilization; spermatozoa very motile and aggregated in rings around the eggs.

A parallel experiment with gametes from *Paracentrotus lividus* gave the same result. In some experiments fertilized eggs (less than 10 per cent) were found both in the FeInh(Fu) solution and in the combination FeInh(Fu)—ATP. The experiments indicate that ATP in the concentrations used is not able to remove the effect of the fertilization inhibitor (Fucus).

Sea urchin eggs of all species examined form low, adhering and granular membranes upon insemination in the presence of the protamin clupein [10, 15]. The defective membranes often burst in the cleavage stages and blastomeres fall apart. When using clupein (0.005–0.025 per cent) the jelly coats are precipitated forming more or less strong boundaries around the eggs. Upon sperm addition, adhering, granular membranes are always formed below the jelly boundaries in these eggs. Since ATP improves membrane formation in normal eggs, it was interesting to investigate if ATP also transformed the adhering, low clupein membrane into a smooth, elevated membrane. It may here be mentioned that Kriszat and Runnström [3] found ATP to improve membrane elevation in eggs pretreated with coldicine, a pretreatment which is injurious to the membrane formation. As previously mentioned, the same authors also found that ATP counteracts the inhibitory effect on membrane formation exerted by jelly solution and heparin [7, 8, 12]. According to experiments on eggs subjected to ATP and clupein treatment in combination, ATP is not able to remove the injurious influence of clupein. See Table 3.

Table 3. Fertilization of *Arbacia* eggs surrounded by their jelly coats in (1) clupein, (2) ATP (from Sigma Chemical Co.), and (3) in combinations of clupein and ATP. The eggs were pretreated for 30 minutes before insemination.

Medium	Observations 80 minutes after insemination
2 ml sea water (control)	90% fertilization; some eggs with gelatinous rims, some with slightly elevated membranes.
1.8 ml 0.025% clupein + 0.2 ml sea water	Jelly coats precipitate in rings around the eggs. Below these rings adhering, granular membranes.
2 ml 0.001 M ATP	100% fertilization; well elevated membranes.
1.8 ml 0.025% clupein + 0.2 ml 0.1 M ATP	Jelly coats precipitated in rings around the eggs. Below these rings adhering, granular membranes.
1.8 ml 0.025% clupein + 0.2 ml 0.01 M ATP	Jelly coats precipitated in rings around the eggs. Below these rings adhering, granular membranes.

In a parallel experiment with egg and sperm material from *Paracentrotus lividus* similar results were obtained. The membranes of the control were, however, well elevated. As indicated by the experiment presented in Table 3 the fertilization membrane remains attached to the egg surface and becomes granular in the presence of clupein. ATP is not able to remove the effect of clupein. Nor does any improvement in membrane formation result upon addition of ATP to eggs, the granular and seamlike membranes of which were already formed in clupein.

#### b) Influence of ATP on the behaviour of eggs upon dilution of the medium

ATP not only interferes with membrane formation in the sea urchin egg but also has a striking effect upon the cytoplasmic state of the eggs. Runnström and Kriszat showed that the rigidity of the cytoplasm in unfertilized eggs is increased in the presence of ATP [4, 11]. By means of the centrifuge microscope they demonstrated that the rigidity of the unfertilized egg increases subsequent to treatment with 0.003 M ATP in sea water [4, 11]. ATP brings about a coagulation process in the cytoplasm, the vitelline membrane, and the jelly coat. These changes become particularly obvious if the medium is highly diluted. Experiments of this type are described by Runnström and Kriszat [11] for the sea urchin species *Psammechinus miliaris* and *Echinocardium cordatum*.

The present work reports the first experiments of this kind performed in 1948 on unfertilized eggs of *Arbacia lixula*. One typical experiment is described below:

I. Unfertilized eggs of *Arbacia lixula* surrounded by their jelly coats were transferred to the following media:

- 1) 2 ml sea water
- 2) 2 ml 0.002 M ATP (preparation made by Ernster)
- 3) 2 ml 0.001 M ATP

II. Unfertilized eggs of *Arbacia lixula* deprived of their jelly coats (the jelly was removed by lowering the pH to about 3.5 for 30 seconds, for methods see [9]) were immersed in the following solutions:

- 1) 2 ml sea water
- 2) 2 ml 0.002 M ATP (preparation made by Ernster)
- 3) 2 ml 0.001 M ATP

After 30 minutes 12 ml. redistilled water was added to all bowls. The eggs sank to the bottom and the water was then removed by means of a fine pipette, connected with a water pump, until the volume was reduced to about 2 ml.

45 minutes later the eggs in the different bowls were examined and the following notes were made:

I. 1) No agglutination of the eggs occurred. The vitelline membrane of most eggs burst at one point and the cytoplasm flowed out. The jelly coat usually exhibited a local weak precipitation above this very point. See Fig. 3.

2) Several eggs agglutinated due to the stickiness of the jelly coats. Most eggs remained spherical. The vitelline membrane precipitated thus keeping the cytoplasm from disintegration. Exovates were formed from many eggs but these remained small and attached to the bulk of the cytoplasm. The jelly coat was often precipitated forming a strong boundary surrounding the whole egg. In some eggs a strong membrane was formed below the jelly boundary. See Fig. 4.

3) The agglutination of the eggs was stronger than in 2). It was characteristic that the jelly precipitation was most pronounced in the agglutinated eggs. The vitelline membrane also seemed to be precipitated and was far more resistant to hypotonic sea water than was the vitelline membrane of the control. The latter usually burst when the medium was rendered hypotonic. Most eggs exhibited strong membranes below the jelly boundaries. These membranes were to a variable extent separated from the cytoplasmic surface of the egg.

The differences in agglutination between the control eggs and the eggs subjected to ATP treatment was even visible macroscopically.

II. 1) The vitelline membrane had burst in most eggs and the endoplasm flowed out.

2) The vitelline membrane seemed to be much tougher than that of the control and seldom burst. Most of the eggs remained spherical and their cytoplasm seemed to be coagulated.

3) About the same result was obtained as in 2).

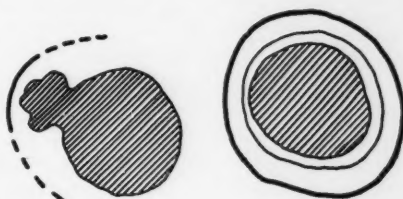


Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 3 and 4. Schematic figures of unfertilized *Arbacia* eggs in hypotonic medium. Fig. 3 shows a control egg and Fig. 4 an egg pretreated with ATP for 30 minutes before the medium was rendered hypotonic. See text.

From this experiment it is evident that the vitelline membrane becomes tougher in the ATP treated eggs than in the control eggs. The ATP treated eggs do not burst to the same extent in hypotonic medium as do the control eggs. The cytoplasm of the ATP treated eggs is more coherent and resistant to hypotonicity than is that of the control eggs. Runnström and Kriszat [11] claim that the behaviour of ATP treated eggs in a hypotonic medium is rather similar to that of fertilized eggs. The ATP treated non fertilized eggs remain spherical as fertilized eggs and the ground substance of their cytoplasm appears as a coherent framework. In the control eggs, on the other hand, the vitelline membrane bursts upon dilution of the medium. The cytoplasm flows out later and disintegrates into separate granules and blisters. Sometimes even the ATP treated eggs form exovates, but these are comparatively small and often remain fixed to the bulk of the cytoplasm.

The experiment further reveals that the jelly precipitation is stronger in the ATP treated eggs than in the control eggs. In the latter the jelly is usually weakly precipitated just outside the point of the egg surface where the endoplasm flows out. The jelly of the ATP treated eggs, on the other hand, precipitates as a strong boundary around the whole egg. Below this boundary a smooth membrane is often visible. Furthermore, the eggs treated with ATP agglutinate more or less in a hypotonic medium.

### Summary

The influence of adenosine triphosphate (ATP) on the membrane formation (I) and the cytoplasmic state (II) in eggs of the sea urchin species *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus* was studied. The following observations were made:

I. *Arbacia* eggs which formed low, adhering gelatinous rims upon insemination in sea water exhibited well elevated, tough membranes if ATP in appropriate concentrations (0.0001–0.01 M, depending on the preparation used) was present at the moment of fertilization. When the insemination occurred in ATP, the percentage of fertilized eggs amounted to 100 or close to 100 even if the value was much lower in the control eggs. The membrane elevation set in earlier in the presence of ATP than in pure sea water. The further development was also more rapid and regular in ATP than in sea water.

ATP in the concentrations used did not counteract the effect of the fertilization inhibitor (Fucus).

ATP was not able to transform the adhering and granular membranes formed in clupein to well elevated membranes.

II. Unfertilized *Arbacia* eggs pretreated with ATP (0.001–0.002 M) became more resistant to hypotonicity than the control eggs. The vitelline membranes of the ATP treated eggs were tougher than those of the control eggs. Consequently these eggs did not burst to the same extent in a hypotonic medium as did the eggs of the control. The ATP treated eggs often remained spherical like fertilized eggs. Their cytoplasm appeared as



a coherent framework. Furthermore, the ATP treated eggs agglutinated in the hypotonic medium and the jelly was more precipitated in these eggs than in the control eggs. Below the precipitated jelly coat a strong membrane often was visible.

### Acknowledgments

I wish to express my warmest thanks to Professor John Runnström for his continued guidance and active interest in my work. I am also greatly indebted to Professor R. Dohrn and the staff at the Stazione Zoologica, Naples, for laboratory facilities and for a generous supply of material.

The work was financially supported by grants from Hierta-Retzius stipendiefond and C. F. Liljevalch J: rs stipendiefond; this support is gratefully acknowledged.

From Stazione Zoologica, Naples, and the Wenner-Gren Institute for Experimental Biology, University of Stockholm.

### References

- [1] Harding, C. V., 1951: *Exper. Cell Research* 2, 405.
- [2] Kriszat, G., 1952: *Exper. Cell Research* 3, 584.
- [3] — and J. Runnström, 1951: *Arkiv Zool.* (2) 4, 143.
- [4] — — 1951: *Trans. N. Y. Acad. Sci.* (2), 13, 162.
- [5] Runnström, J., 1947: *Arkiv Zool.* 40 A, No. 1.
- [6] — 1949: *Advances in Enzymol.* 9, 241.
- [7] — 1950-1951: *Harvey, Lectures, Ser. XLVI*, 116.
- [8] — 1952: *Symposia Soc. Exper. Biol.* VI, 39.
- [9] — L. Monné, and L. Broman, 1945: *Arkiv Zool.* 35 A, No. 3.
- [10] — — and E. Wicklund, 1946: *J. Colloid Sci.* 1, 421.
- [11] — and G. Kriszat, 1950: *Exper. Cell Research* 1, 284.
- [12] — — 1950: *Exper. Cell Research* 1, 497.
- [13] — and E. Wicklund, 1950: *Arkiv Zool.* (2), 1, 179.
- [14] — — and H. Löw, 1954: *Exper. Cell Research* 6, 459.
- [15] Wicklund, E., 1947: *Arkiv Zool.* 40 A, No. 5.
- [16] — 1949: *Arkiv Zool.* 42 A, No. 11.
- [17] — 1954: *Arkiv Zool.* (2), 6, 485.

### Kurze Mitteilung

## Beobachtungen über das Plasmolyseverhalten von *Spirotaenia condensata* Bréb

Von

Ingeborg Krebs

Mit 1 Textabbildung

(Eingelangt am 23. Juli 1953)

Bei der grenzplasmolytischen Bestimmung der osmotischen Werte des Desmidiaceen-Materials (Krebs 1951), das an verschiedenen Standorten in der Ramsau bei Schladming und in den Niederen Tauern auf der Planei (1904 m) gesammelt worden war, fiel auf, daß die Zellen von *Spirotaenia condensata* keine Plasmolyse zeigten. Die Konzentration der Traubenzuckerlösung wurde bis auf 2,0 mol erhöht, ohne daß sich der Protoplast von der Zellwand löste. Ab 0,4 mol Traubenzucker waren viele Zellen von der Seite her ungleichmäßig zusammengedrückt, so daß sie zum Teil Biskottenform aufwiesen. In selteneren Fällen waren die Zellen nur von einer Seite her eingebuchtet.

In Glycerin und Harnstoff bot sich das gleiche Bild. In Konzentrationen über 0,4 mol waren die meisten Zellen deformiert, bei keiner einzigen jedoch war Plasmolyse eingetreten.

Auch bei Anwendung leicht diffusibler Salze, wie KCl und  $\text{CaCl}_2$ , kam es stets nur zu kollapsartigen Erscheinungen. Der einzige Unterschied gegenüber den organischen Verbindungen bestand darin, daß neben den seitlich zusammengedrückten Zellen auch solche vorkamen, bei denen der Druck von den Polen her am stärksten zu sein schien, so daß die Menisken der Zelle in den Zylinder geschoben waren, und zwar häufig an beiden Zellenden. Bemerkenswert war, daß in 0,4 mol KCl ungefähr zwei Drittel aller Zellen (81) seitlich und etwa ein Drittel (42) von den Polen her zusammengedrückt waren, während in 0,4 mol  $\text{CaCl}_2$  das Verhältnis umgekehrt war (61 seitlich zu 100 polar). Die Zellwand preßte sich eng an den Chromatophor an und zwängte sich in Form kleiner Falten zwischen die Windungen. Daraus läßt sich folgern, daß der Chromatophor eine gewisse Festigkeit besitzt, während die Zellwand nicht besonders starr sein kann. Möglich ist auch eine besonders feste Verbindung zwischen Membran und Protoplasten. Vgl. Abb. 1.

Über die Steifheit des Chromatophors gaben Zentrifugierungsversuche Aufschluß. Während die Mehrzahl der Desmidiaceen bereits nach 10 Minuten langer Schleuderung mit 2700 Touren starke Verlagerung des Zellinhaltes aufweist, sind nach einer Stunde nur etwa bei 50% aller *Spirotaenia*-Zellen schwache Stauchungen des Spiralbandes an einem Zellpol und

etwas weitere Windungen am anderen Ende zu beobachten. Erst nach ein-stündiger Schleuderung mit 3500 Touren ist der Chromatophor fast aller Zellen gestaut und auch häufig vom Pol gelöst. Trotzdem bleibt die Band-form erhalten, und nach spätestens 3 Tagen ist die Restitution soweit fort-geschritten, daß die Zellen von nicht zentrifugierten nicht mehr zu unter-scheiden sind. In keinem einzigen Fall wurde der Chloroplast zu einem formlosen Klumpen zusammengeschleudert, wie es bei vielen Desmidiaceen die Regel ist (vgl. Krebs 1951, S. 609). Die Mesotaeniale *Spirotaenia con-densata* gehört zweifellos dem Typus mit „steifem Chromatophor“ an.

Die Frage, ob die Verbindung zwischen Zellmembran und Protoplast überhaupt nicht zu lösen sei, wurde auf folgende Weise untersucht. Die Zellen von *Spirotaenia* wurden in die verschiedenen Plas-molytika eingebettet und mit Vaseline von der Luft ab-geschlossen, um das Verdunsten und damit Konzentrier-terwerden der Lösung zu verhindern. Sowohl in 0,25 als auch in 0,4 mol KCl waren die Zellen zusammengedrückt und starben im Laufe des nächsten Tages ab. In den an-deren Plasmolytika war nach einigen, spätestens 24 Stun-den der Protoplast etwas von der Zellwand abgehoben, und zwar nicht nur an den Zellpolen, sondern auch an den Längsseiten. Die Entfernung zwischen Membran und Protoplast vergrößerte sich in  $\text{CaCl}_2$  und Traubenzucker immer mehr, bis nach 3 Tagen die meisten Zellen ab-gestorben waren. In Harnstoff dagegen ist von der anfangs geringen Abhebung schon nach 5 Stunden nichts mehr zu bemerken. Die Spiralbänder sind deutlich zu sehen und die einzelnen Umgänge weit voneinander entfernt. Die Zellen sind länger und breiter als vor der Behandlung mit Harnstoff. Nach 2 Tagen sind sie abgestorben, jetzt wieder klein und zusammengefallen. In Glyzerin kann man das gleiche Schauspiel beobachten, nur daß die Zellen in die-sem weit harmloseren Plasmolytikum noch nach 5 Tagen gesund sind, trotzdem ihr Volumen auf das Doppelte an-gestiegen ist. Diese fast unheimlich anmutende Dehnungs-fähigkeit der Zellwand dürfte unter den Desmidiaceen wohl einzig dastehen.

Wir finden schon bei Lütke Müller (1902) den Hinweis, daß bei *Spiro-taenia condensata* die gesamte Membran der kopulierenden Zellen durch den aktiven Einfluß des lebenden Zellplasmas verquellen kann. Die Gallert-massen, welche die Zellen umgeben und mit deren Hilfe auch die Bewegung erfolgt, werden nicht wie bei den *Desmidiales* vom Protoplasten, sondern durch Verquellen der äußeren Zellwandschichten gebildet (vgl. Krieger 1953). Über das auffallende Verhalten der Gallerte gegenüber Vitalfarb-stoffen liegen Untersuchungen von Höfler und Schindler (1952) vor.

Lütke Müller gibt an, daß die Membran von *Spirotaenia* keine Zello-sereaktion, wie Blaufärbung mit Jod und Schwefelsäure, Rötlichfärbung durch Chlorzinkjod und Lösung in Kupferoxydammoniak, zeigt. Er ver-mutet, daß es sich um eine Modifikation von Zellulose handelt, und zwar um den gleichen Stoff, der sich auch in der Außenschicht der Zellwand von *Desmidiales* neben Zellulose findet, während die Innenschicht dort nur aus reiner Zellulose besteht.



Abb. 1. *Spiro-taenia condensata* in 0,4 mol  $\text{CaCl}_2$  nicht plas-molysiert, son-der von den Polen her ge-staut.

F. E. Fritsch (1948) hebt ebenfalls hervor, daß die Zellwand von *Spirotaenia* nicht restlos in Kupferoxydammoniak löslich ist und daher nicht aus reiner Zellulose bestehen kann.

Der Grund für das auffallende Plasmolyseverhalten von *Spirotaenia condensata* dürfte demnach vor allem in der chemischen Zusammensetzung der Zellwand liegen; es ist aber nicht ausgeschlossen, daß dabei auch der „steife Chromatophor“ und die feste Verbindung von Membran und Protoplast eine wesentliche Rolle spielen.

#### Literatur

- Fritsch, F. E., 1948: The structure and reproduction of the algae. Vol. I. Cambridge.
- Höfler, K., und H. Schindler, 1952: Algengallerten im Vitalfärbeversuch. Österr. Bot. Zeitschr. 99, 529.
- Krebs, I., 1951: Beiträge zur Kenntnis des Desmidiaceen-Protoplasten. I. Osmotische Werte, II. Plastidenkonsistenz. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, 160, 579.
- 1952: Desgl. III. Permeabilität. Ebenda, 161, 291.
- Krieger, W., 1935: Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außer-europäischen Arten. Rabenhorsts Kryptogamenflora 13, I. Abt.
- Lütkenmüller, J., 1902: Die Zellmembran der Desmidiaceen. Cohn's Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 8, 347.

### Referate

**Molisch, Hans: Anatomie der Pflanze.** 6., neubearbeitete Auflage von Karl Höfler. Mit 171 Abb., 180 S. Jena: VEB Fischer 1954. Geb. DM 8.—.

Wenn ein Lehrbuch seinen Schöpfer jahrzehntelang überlebt, so ist dies ein eindeutiger Beweis für den didaktischen Wert des Buches. Nicht gering ist aber auch das Verdienst Höflers, der in pietätvoller Treue zu seinem einstigen Lehrer immer wieder die Neubearbeitung übernommen hat. Höfler versteht es, in den Geist der einprägsamen Schlichtheit der Darstellung, die den von keiner anderen Einführung erreichten Vorzug des Buches ausmacht, sich einzufühlen und so das Buch wirklich im Geiste von Molisch weiterzuführen. Dabei verzichtet die Neubearbeitung nicht etwa darauf, wo es nötig wird, Neues einzufügen, besonders kommt die Bedeutung der Mikrochemie für die Anatomie in stärkerem Maße als bisher zum Ausdruck. Das reiche Abbildungsmaterial ist durch einige neue Figuren ergänzt, die ebenso vorzüglich sind wie die bisherigen. Es ist erstaunlich und erfreulich, daß es möglich war, den Preis des Buches trotz Vermehrung des Textes und der Abbildungen relativ niedrig zu halten. Neben der unbestrittenen Güte des Lehrbuches wird dies dazu beitragen, daß es für die Studierenden das Buch sein und bleiben wird, das sie zur Einführung wählen.

A. Weber (Graz).

**Kamiya, N., and W. Seifriz: Torsion in a Protoplasmic Thread.**

Expt. Cell Res. 6, 1—16 (1954).

Ein aus einem Myxomyceten-Plasmodium ausgezogener Faden, welcher an beiden Enden in einem luftfeuchten Raum befestigt ist, strebt nach den bemerkenswerten Versuchen zu spiralförmiger Aufwindung. Wenn der Faden nur einerseits befestigt wird, so führt das freie Ende bei Zimmertemperatur in fast konstanter Periode Rotationen aus, welche mittels einer ingenieösen Versuchsanordnung mit Spiegelvorrichtung gemessen werden. Beim Betrachten von oben erfolgt die Rotation häufiger in Gegenzeiger- als in Uhrzeigerichtung. Diskutiert wird die Möglichkeit, die Rotationen auf reconversion of junctions des lebenden Protoplasmagels zurückzuführen. Obgleich neben der Rotation noch longitudinale Kontraktion und Verlängerung des Protoplasmafadens einhergehen, stehen diese doch nicht in Abhängigkeit von jener, wie denn auch die bekannte Strömung des Plasmodiums nicht mit der Rotation in Beziehung steht. (Wesentlich sind die hoffentlich noch fortgesetzten messenden Versuche, insofern sie auch einen noch nicht beschrittenen Weg zum Beweise der Elastizität des Protoplasmas aufzeigen.)

H. H. Pfeiffer (Bremen).

L

4

S

4

I



Kurze Mitteilung

Krebs, Inge: Beobachtungen über das Plasmolyseverhalten von <i>Spirotaenia condensata</i> Bréb. . . . .	106
---	-----

Referate . . . . .	109
--------------------	-----

**Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:**

Scheidt, W.: Vakuolenkontraktion bei vollen Zellsäften an Zwiebelzellen von <i>Tulipa silvestris</i> und <i>Colchicum speciosum</i> . . . . .	23. 12. 1953
Flasch, Assunta, und H. Kinzel: Rasche Bildung von Entmischungskörpern in Zellsäften von <i>Bucus sempervirens</i> . . . . .	22. 1. 1954
Diakus, A.: Vitalfärbungsstudien an Euglenaceen . . . . .	8. 2. 1954
Biebl, E., und Waltraut Kossl-Pillhofer: Die Änderung der chemischen Resistenz pflanzlicher Plasmen mit dem Entwicklungszustand. . . . .	12. 3. 1954
Johannes, H.: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien . . . . .	6. 4. 1954
Luger, H.: Der Einfluß der Ascorbinsäure auf die Assimilation und Atmung höherer Pflanzen . . . . .	8. 4. 1954
Kaja, H.: Untersuchungen über die Chromatophoren und Pyrenoide der <i>Anthocerotales</i> . . . . .	12. 4. 1954
Hagström, B., and J. Runnström: The Effect of N-Ethylmaleimide on the Fertilization of the <i>Sea Urchin</i> Egg . . . . .	15. 4. 1954
Düvel, D.: Beiträge zur Kenntnis der Struktur und Entwicklung der Chloroplasten . . . . .	22. 4. 1954
Kenda, Griseldis: Eiweißspindeln in <i>Opuntia monacantha variegata</i> . . . . .	28. 4. 1954
Sponsler, L., and J. D. Bath: Some Micellar Components of <i>Physarum polycephalum</i> as Revealed by the Electron Microscope . . . . .	30. 4. 1954
Kopetzky-Rechtperg, O.: Beobachtungen an Protoplasma und Chloroplasten der Alge <i>Netrium digitus</i> (Ehrenberg) bei Kultur unter Lichtabschluß . . . . .	7. 5. 1954
Linser, H.: Die Wachstoffsirksamkeit von $\beta$ -Naphthoxyessigsäure und Indol-3-essigsäure in gepufferten Lanolinpasten verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen . . . . .	13. 5. 1954
Grave, Gisela: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei <i>Agapanthus umbellatus</i> . . . . .	22. 5. 1954
Sponsler, O. L., and J. D. Bath: Some Features of <i>Nitzella</i> Chloroplasts as Revealed by the Electron Microscope. . . . .	14. 6. 1954
Bierling, R.: Zur Bedeutung der lokalen Mitochondriendichte für die Formkonstanz von Zellen . . . . .	25. 6. 1954
Lettré, H., und Annelies Schleieh: Zur Bedeutung der Adenosintriphosphorsäure für Formkonstanz und Formänderungen von Zellen. . . . .	30. 6. 1954
Nagai, S.: The Reduction of Silver Nitrate by Plant Cells, particularly by Chloroplasts . . . . .	24. 6. 1954
Ziegler, Magda: Untersuchungen über Wundreizreaktionen an Pflanzen . . . . .	10. 7. 1954
Wiede, M., und F. Meyer: Über die Toxizität einiger Fluorochrome . . . . .	26. 7. 1954

Printed in Austria

